

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/033499 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/18, C12P 21/08,  
A61K 39/395, A61P 35/00, 37/02, 43/00

地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 川合 重人  
(KAWAI, Shigeto) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市  
駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka  
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013063

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003)

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-299289  
2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中  
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間 5 丁  
目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 尾崎 修治 (OZAKI, Shuji) [JP/JP]; 〒770-0804  
徳島県 徳島市 中吉野町 3 丁目 5 0-1 Tokushima (JP).  
安倍 正博 (ABE, Masahiro) [JP/JP]; 〒770-0033 徳島県  
徳島市 南佐古 3 番町 7-1 2 Tokushima (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土屋 政幸  
(TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御  
殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会  
社内 Shizuoka (JP). 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP];  
〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL DEATH-INDUCING AGENT

(54) 発明の名称: 細胞死誘導剤

(57) Abstract: In order to identify an antigen to 2D7 antibody, a 2D7 antigen is cloned. As a result, it is indicated that the 2D7 antigen is an HLA class I molecule. Based on this finding, it is discussed whether the 2D7 antibody has an activity of inducing cell death or not. As a result, nuclear fragmentation is observed by further crosslinking the 2D7 antibody with another antibody, thereby indicating that cell death is induced. It is also clarified that a diabody of the 2D7 antibody has an extremely strong cell death-inducing activity even though no other antibody is added. These results point out that a degradation product of an antibody recognizing HLA is usable as a cell death-inducing agent.

(57) 要約: 本発明者らは、2D7抗体の抗原を同定することを目的として、2D7抗原のクローニングを行った。その結果、2D7抗原はHLA class I分子であることが示唆された。本発明者らは、この知見に基づき、2D7抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。その結果、2D7抗体をさらに別の抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。さらに、2D7抗体のDiabodyは、さらに別の抗体を添加しなくても非常に強力な細胞死誘導活性を有することが判明した。以上の結果は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

WO 2004/033499 A1

- 1 -

## 明細書

## 細胞死誘導剤

- 5 本発明は、HLA を認識する抗体の低分子化抗体に関する。

背景技術

- HLA class I 抗原は、3つのドメイン ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ) からなる 45KD の  $\alpha$  鎖と、12KD の  $\beta 2$  ミクログロブリンのヘテロダイマーによって形成される。HLA  
10 分子の主な役割は、細胞の中で作られる 8~10 程度のアミノ酸でできた抗原ペプチドを CD8<sup>+</sup>T 細胞に提示することであり、これによって誘導される免疫応答や免疫寛容に非常に重要な役割を担っている。

- また、HLA class IA 抗原の抗体によるライゲーションで、細胞増殖抑制や細胞死誘導効果がリンパ球細胞において観察されており、HLA 分子のシグナル伝達分子としての可能性も示唆されている。  
15

- すなわち、例えばヒト HLA class IA の  $\alpha 1$  ドメインに対する抗体 B9.12.1、 $\alpha 2$  ドメインに対する抗体 W6/32、 $\alpha 3$  ドメインに対する抗体 TP25.99、A1.4 は、活性化リンパ球に対して細胞増殖を抑制するとの報告がある（非特許文献 1，2）。  
また、 $\alpha 1$  ドメインに対する二種類の抗体 MoAb90，YTH862 は、活性化リンパ球に対してアポトーシスを誘導することが報告されている（非特許文献 2，3，4）。  
20 この 2つの抗体によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼを介した反応であることが明らかにされており（非特許文献 4）、このことからリンパ細胞で発現する HLA class IA 抗原は、アポトーシスの信号伝達にも関与していると推測されている。

- 25 さらに、ヒト HLA class IA の  $\alpha 3$  ドメインに対する抗体 5H7（非特許文献 5）、マウス HLA class IA の  $\alpha 2$  ドメインに対する抗体 RE2（非特許文献 6）も、活性

- 2 -

化リンパ球などに細胞死を誘導することが報告されている。しかしながら前出のアポトーシス誘導抗体 MoAb90 や YTH862 とは違い、これらの抗体によって誘導される細胞死は、いずれもカスパーゼを介さないことが示されている。このことから、5H7 や RE2 による細胞死は、従来知られているアポトーシスの機構とはまったく異なるタイプの細胞死であると推測されている。

5 以上のように、抗 HLA 抗体による細胞増殖抑制、細胞死誘導作用に関する報告はこれまで複数なされている。ただし、ここで利用されている抗体の分子形態はいずれも IgG 抗体、もしくは F(ab')<sub>2</sub>、Fab であり、また F(ab')<sub>2</sub> や Fab のように抗体を低分子化することで、細胞死誘導活性が上昇したとの知見は今のところな

10 い。

一方 2D7 抗体は、ヒトミエローマ細胞を Balb/c マウスに免疫して得たマウスモノクローナル抗体である（非特許文献 7）。これまで 2D7 抗体が、種々のリンパ系腫瘍細胞の細胞表面に高い特性を持って結合することは確認されていたが、2D7 抗体が認識する抗原については同定されてはいなかった。

15 なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

- [非特許文献 1] Fayen et al., Int. Immunol 10: 1347-1358 (1998)
- [非特許文献 2] Genestier et al., Blood 90: 3629-3639 (1997)
- [非特許文献 3] Genestier et al., Blood 90: 726-735 (1997)
- [非特許文献 4] Genestier et al., J. Biol. Chem. 273: 5060-5066 (1998)
- 20 [非特許文献 5] Woodle et al., J. Immunol. 158: 2156-2164 (1997)
- [非特許文献 6] Matsuoka et al., J. Exp. Med. 181: 2007-2015 (1995)
- [非特許文献 7] Goto, et al. Blood 84: 1922 (1994)

#### 発明の開示

25 本発明の第一の目的は、HLA class IA を認識する抗体の低分子化抗体を提供することにある。本発明のさらなる目的は、この低分子化抗体を利用した新たな腫

瘍または自己免疫疾患の治療剤を提供することにある。

本発明者らは、2D7 抗体の抗原を同定することを目的として、まず、2D7 抗原発現細胞 RPMI8226 より精製した mRNA から、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成した。これをレトロウイルスベクター pMX に挿入し、レトロウイルス発現ライブラリーを作製した。該レトロウイルス発現ライブラリーを BOSC23 細胞にトランスフェクトすることでレトロウイルスにパッケージングした。その後得られたウイルスを NIH3T3 細胞に感染させ、2D7 抗体で染色した後、FACS により発現解析を行うことで、2D7 抗原のスクリーニングを行った。さらに、2D7 抗原を発現している RPMI8226 細胞、および、U266 細胞により cell lysate を調整し、免疫沈降法により 2D7 抗原の同定を行った。これらの検討の結果、2D7 抗原は HLA class I 分子であることが判明した。

2D7 抗体が認識する分子が HLA class IA であったことから、本発明者らは、2D7 抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。具体的には、Jurkat 細胞に 2D7 存在下あるいは非存在下で、さらに抗マウス IgG 抗体を加え培養を行い、48 時間後、細胞核を Hoechst33258 で染色し、死細胞に特徴的な細胞核の断片化が認められるか観察した。その結果、Jurkat 細胞において、2D7 抗体単独ではほとんど細胞死誘導活性が検出されなかったが、さらに抗マウス IgG 抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。

このように 2D7 抗体による細胞死誘導には抗マウス IgG 抗体によるクロスリンクが必要であるため、腫瘍または自己免疫疾患に対する 2D7 抗体の臨床応用は難しい。そこで、本発明者らは、細胞死誘導に対する 2D7 抗体の低分子化の効果を検討した。具体的には、ハイブリドーマより 2D7 抗体の可変領域をコードする遺伝子をクローニングし、遺伝子改変技術により 2D7 抗体の Diabody 化を行い、細胞死誘導活性に対する効果を検討した。その結果、驚くべきことに、Diabody 化した 2D7 抗体は、抗マウス IgG 抗体によるクロスリンクを行わなくても、非常に短時間かつ低い用量で強力な細胞死誘導活性を示した。また、該 Diabody は、正

- 4 -

常末梢血由来リンパ球や、付着細胞にはほとんど作用せず、各種ミエローマ細胞や T 細胞白血病細胞株、活性化リンパ球に対してのみ特異的に細胞死を誘導した。以上の結果は、HLA を認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

- 5 即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔23〕を提供するものである。
- 〔1〕 ヒト白血球抗原 (HLA) を認識する低分子化抗体。
  - 〔2〕 HLA が HLA class I である、〔1〕に記載の低分子化抗体。
  - 〔3〕 HLA class I が HLA-A である、〔2〕に記載の低分子化抗体。
  - 〔4〕 2D7 抗体の低分子化抗体。
- 10 〔5〕 低分子化抗体が Diabody である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の低分子化抗体。
- 〔6〕 以下の (a) ～ (d) のいずれかに記載の低分子化抗体。
- (a) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
  - (b) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(a)に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 15
- (c) 配列番号：2の CDR および配列番号：4の CDR のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
  - (d) 配列番号：2の CDR および配列番号：4の CDR のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(c)に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 20
- 〔7〕 HLA を認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。
- 25
- 〔8〕 HLA が HLA class I である、〔7〕に記載の方法。

- [ 9 ] HLA class I が HLA-A である、[ 8 ] に記載の方法。
- [ 1 0 ] 2D7 抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。
- 5 [ 1 1 ] 低分子化が Diabody 化である、[ 7 ] ～ [ 1 0 ] のいずれかに記載の方法。
- [ 1 2 ] 活性が細胞死誘導活性又は細胞増殖抑制活性である、[ 7 ] ～ [ 1 1 ] のいずれかに記載の方法。
- [ 1 3 ] [ 1 ] ～ [ 6 ] のいずれかに記載の低分子化抗体、[ 7 ] ～ [ 1 2 ] のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7
- 10 抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。
- [ 1 4 ] B 細胞または T 細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、[ 1 3 ] に記載の細胞死誘導剤。
- [ 1 5 ] B 細胞または T 細胞が、活性化 B 細胞または活性化 T 細胞である、[ 1 4 ] に記載の細胞死誘導剤。
- 15 [ 1 6 ] [ 1 ] ～ [ 6 ] のいずれかに記載の低分子化抗体、[ 7 ] ～ [ 1 2 ] のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。
- [ 1 7 ] [ 1 ] ～ [ 6 ] のいずれかに記載の低分子化抗体、[ 7 ] ～ [ 1 2 ] のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7
- 20 抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。
- [ 1 8 ] 腫瘍が血液腫瘍である [ 1 7 ] に記載の抗腫瘍剤。
- [ 1 9 ] [ 1 ] ～ [ 6 ] のいずれかに記載の低分子化抗体、[ 7 ] ～ [ 1 2 ] のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。
- 25 [ 2 0 ] 抗体が Diabody である [ 1 3 ] ～ [ 1 5 ] のいずれかに記載の細胞死誘導剤。

- 6 -

〔21〕 抗体が Diabody である〔16〕に記載の細胞増殖抑制剤。

〔22〕 抗体が Diabody である〔17〕または〔18〕に記載の抗腫瘍剤。

〔23〕 抗体が Diabody である〔19〕に記載の自己免疫疾患治療剤。

本発明は、HLA を認識する低分子化抗体を提供する。本発明における低分子化  
5 抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に  
結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、細胞死誘  
導作用、アポトーシス誘導作用、細胞増殖抑制作用、細胞分化抑制作用、細胞分  
裂抑制作用、細胞増殖誘導作用、細胞分化誘導作用、細胞分裂誘導作用、細胞周  
期調節作用などを挙げることができるが、好ましくは細胞死誘導作用、細胞増殖  
10 抑制作用である。

細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用などの上記作用の対象となる細胞は特に限  
定されないが、血球系細胞や浮遊細胞が好ましい。血球系細胞の具体的な例とし  
ては、リンパ球（B 細胞、T 細胞）、好中球、好酸球、好塩基球、単球（好ましく  
は活性化した末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC))、ミエ  
15 ローマ細胞などを挙げることができるが、リンパ球（B 細胞、T 細胞）、ミエロー  
マ細胞が好ましく、T 細胞または B 細胞（特に活性化した B 細胞または活性化し  
た T 細胞）が最も好ましい。浮遊細胞は、細胞を培養した際、細胞がガラスやプ  
ラスチックなどの培養器の表面に付着することなく、浮遊状態で増殖する細胞であ  
る。これに対し、接着細胞（付着細胞）とは、細胞を培養した際、ガラスやプラ  
20 スチックなどの培養器の表面に付着する細胞である。

本発明においては、上記 HLA を認識する低分子化抗体を投与することにより、  
例えば、血液腫瘍（造血器腫瘍）などの腫瘍（具体的な例として、白血病、骨髄  
異形成症候群、悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、形質細胞異常症（骨髄腫、多  
発性骨髄腫、マクログロブリン血症）、骨髄増殖性疾患（真性赤血球増加症、本  
25 態性血小板血症、特発性骨髄繊維症）など）や自己免疫疾患（具体的な例として、  
リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫

- 7 -

- 性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巢炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、
- 5 水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病など) のような疾患の治療、予防などをおこなうことが可能である。

- 本発明において、HLA とは、ヒト白血球抗原を意味する。HLA 分子は class I と class II に分類され、class I としては HLA-A、B、C、E、F、G、H、J などが知られており、class II としては HLA-DR、DQ、DP などが知られている。本発明の抗
- 10 体が認識する抗原は HLA 分子であれば特に制限されないが、好ましくは class I に分類される分子であり、より好ましくは HLA-A である。

- 本発明において低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えば whole IgG 等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定さ
- 15 れないが、重鎖可変領域 (VH) 又は軽鎖可変領域 (VL) を含んでいることが好ましく、特に好ましいのは VH と VL の両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv (シングルチェーン Fv)、などを挙げるができるが、好ましくは scFv (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun [The Pharmacology of
- 20 Monoclonal Antibodies] Vol.113, Resenbarg 及び Moore 編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)) である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol.
- 25



(1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照)。

5 本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体の VH を 2 つ以上及び VL を 2 つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非  
10 共有結合の両方でよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VH と VL が非共有結合により結合して形成される VH-VL 対を 2 つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中の一方の VH-VL 対と他方の VH-VL 対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

本発明において特に好ましい低分子化抗体は Diabody である。Diabody は、可  
15 変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント (例えば、scFv 等) (以下、Diabody を構成するフラグメント) を 2 つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2 つの VL と 2 つの VH を含む (P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097 号、WO93/11161 号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engin  
20 eering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。Diabody を構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でよいが、好ましくは非共有結合である。

25 また、Diabody を構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖 Diabody (scDiabody) とすることも可能である。その際、Diabody を構成する

- 9 -

フラグメント同士を 20 アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に存在する Diabody を構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成する。

Diabody を構成するフラグメントは、VL と VH を結合したもの、VL と VL を結合したもの、VH と VH を結合したもの等を挙げることができるが、好ましくは VH と VL を結合したものである。Diabody を構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常 2〜14 アミノ酸、好ましくは 3〜9 アミノ酸、特に好ましくは 4〜6 アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされる VL と VH とは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上の VL と VH の間で非共有結合がおこらず、単鎖 V 領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、Diabody 作製と同じ原理で、Diabody を構成するフラグメントを 3 つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

本発明における Diabody としては、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列を有する Diabody または配列番号：6 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有する Diabody であって、配列番号：6 に記載の配列を有する Diabody と機能的に同等な Diabody や、配列番号：2 の CDR（又は可変領域）および配列番号：4 の CDR（又は可変領域）のアミノ酸配列を有する Diabody または配列番号：2 の CDR（又は可変領域）および配列番号：4 の CDR（又は可変領域）のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有する Diabody であって、配列番号：2 の CDR（又は可変領域）および配列番号：4 の CDR（又は可変領域）の配列を有す

- 10 -

る Diabody と機能的に同等な Diabody を例示できるが、これらに限定されるものではない。

ここで「機能的に同等」とは、対象となる Diabody が、配列番号：6 に記載の配列を有する Diabody、または配列番号：2 の CDR（又は可変領域）および配列番号：4 の CDR（又は可変領域）の配列を有する Diabody と同等の活性（例えば、HLA-A への結合活性、細胞死誘導活性など）を有することを意味する。

変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30 アミノ酸以内であり、好ましくは 15 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内（例えば、3 アミノ酸以内）であると考えられる。

- 10    また、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列を有する Diabody または、配列番号：2 の CDR（又は可変領域）および配列番号：4 の CDR（又は可変領域）の配列を有する Diabody を、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的としてヒト化、キメラ化してもよい。

- 15    配列番号：2 に記載されているアミノ酸配列で、1 番目～134 番目が可変領域に相当し、50 番目～54 番目が CDR1、69 番目～85 番目が CDR2、118 番目～134 番目が CDR3 に相当する。配列番号：4 に記載されているアミノ酸配列で、1 番目～128 番目が可変領域に相当し、46 番目～55 番目が CDR1、71 番目～77 番目が CDR2、110 番目～128 番目が CDR3 に相当する。

- 20    本発明において HLA を認識する低分子化抗体は、HLA に特異的に結合し、生物学的作用を有していれば特に制限されない。本発明の低分子化抗体は、当業者に公知の方法により作製することが可能である。例えば、実施例に記載されているように、HLA を認識する抗体の配列（特に可変領域の配列や相補鎖決定領域（CDR）の配列）を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。

- 25    HLA を認識する抗体の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であり、又、HLA を抗原として、当業者に公知の方法により抗 HLA 抗体を作製し、そ

- 11 -

の抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下の  
ようにして行うことができる。HLA タンパク質若しくはその断片を感作抗原とし  
て使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通  
常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法によ  
り、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングする。  
抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（W098/46777 な  
ど）等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルス  
テインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73:  
3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミ  
ン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイ  
ブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V 領域）の cDNA を  
合成し、得られた cDNA の配列を公知の方法により解読すればよい。

HLA を認識する抗体は、HLA と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラッ  
ト抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、  
ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝  
子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体な  
ども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができ  
る。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可  
変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の  
可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結し、こ  
れを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることがで  
きる。

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、  
たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining regi  
on）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組  
換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレーム

- 12 -

ワーク領域 (framework region ; FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる

- 5 ことにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

これらキメラ抗体やヒト化抗体などについては、低分子化した後にキメラ化やヒト化等を行ってもよいし、キメラ化やヒト化等を行った後に低分子化を行ってもよい。

- また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平 1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する scFv の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベク

- 13 -

ターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

- 本発明において、HLA を認識する抗体の好ましい例として 2D7 抗体が挙げられる。2D7 抗体は、配列番号：2 の CDR (又は可変領域) および配列番号：4 の CDR (又は可変領域) の配列を有する抗体が例示できるが、これに限定されるものではなく、配列番号：2 の CDR (又は可変領域) および配列番号：4 の CDR (又は可変領域) の配列において 1 もしくは複数のアミノ酸配列が変異 (置換、欠失、挿入、および/または付加) したアミノ酸配列を有する抗体であって、配列番号：2 の CDR (又は可変領域) および配列番号：4 の CDR (又は可変領域) の配列を有する抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の 2D7 抗体に含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が、配列番号：2 の CDR (又は可変領域) 及び配列番号：4 の CDR (又は可変領域) の配列を有する抗体と同等の活性 (例えば、HLA-A への結合活性、細胞死誘導活性、など) を有することを意味する。
- 変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30 アミノ酸以内であり、好ましくは 15 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内 (例えば、3 アミノ酸以内) であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾された

アミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。また、抗体の定常領域などのアミノ酸配列は当業者に公知である。

また、2D7 抗体を当業者に公知の方法でキメラ化、ヒト化などを行うことも可能であり、このようなキメラ抗体、ヒト化等された抗体も本発明の 2D7 抗体に含まれる。

- 10 本発明の抗体は、ポリエチレングリコール (PEG)、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。
- 15 本発明は、本発明の抗体をコードする DNA を包含する。又、該 DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、抗原への結合能及び活性を有する抗体をコードする DNA を包含する。ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) は当業者に公知であり、ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適
- 20 宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジентな条件が挙げられる。高
- 25 ストリンジентな条件とは、例えば 65°C、5×SSC 及び 0.1%SDS の条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA が効率的に得

られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

- 5     本発明の DNA は、本発明の抗体の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明の DNA は、本発明の抗体をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるかなどを問わない。また、本発明の抗体をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩
- 10    基配列を有する DNA が含まれる。

- 本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体の DNA を発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。
- 15

- ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 などが挙げられる。
- 20

- 本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araB プ
- 25



- 16 -

ロモーター (Better ら, Science (1988) 240, 1041-1043)、または T7 プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製)、「QIAexpress system」(QIAGEN 社製)、pEGFP、または pET(この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい)などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (Invitrogen 社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL 社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター (Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTR プロモーター、EF1 $\alpha$  プロモーター (Mizushima ら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418 など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、

例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1 など）を導入し、メトトレキセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクター (pcD など) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオンリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えば pAdexlcw）やレトロウイルスベクター（例えば pZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、*ex vivo* 法であっても、*in vivo* 法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vit*

- 18 -

ro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. 5 (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. 10 Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリボソーム DOTAP (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。 15

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、 20 アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

25 これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うこと

- 19 -

ができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IM DMを使用することができる。その際、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40℃で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地

5 の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

10 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の DNA を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる（Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594）。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを

- 20 -

用いる場合、目的の DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペ  
5 プチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、  
10 何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イ  
15 オン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液  
20 相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

本発明において、抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手  
段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA  
25 (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

- 21 -

本発明において、本発明の抗体が浮遊細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様に Jurkat 細胞又は ARH77 細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。又、抗体が接着細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様に HeLa 細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。

また、本発明は、本発明の低分子化抗体または 2D7 抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の低分子化抗体または 2D7 抗体の細胞死誘導活性は、活性化された T 細胞または B 細胞で特に効果  
10 大きいと考えられるので、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。このように本発明は、本発明の低分子化抗体または 2D7 抗体を用いた、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）や自己免疫疾患の治療方法や予防方法も提供するものである。低分子化されていない 2D7 抗体を有効成分として用いる場合には、抗 IgG 抗体などでクロスリンクすることが好ましい。

15 上記抗体には各種試薬を結合してコンジュゲート抗体として使用することもできる。このような試薬としては、化学療法剤、放射性物質、トキシンなどを挙げることができる。このようなコンジュゲート抗体は公知の方法により作製することができる（US5057313、US5156840）。

上記薬剤は、直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を  
20 施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面  
25 活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することに

- 22 -

よって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、  
5 ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのよう  
な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。  
調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のような  
10 ベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、  
ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イ  
15 オン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された  
20 注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が  
25 DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年

- 23 -

齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明の薬剤の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1日あたり約 0.1 から 1000mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg であると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、通常、1日当たり約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、pMX2 ベクターの作製に用いたアダプターを示す図である。太字部分は BstXI 認識配列を示している。

図 2 A および図 2 B は、2D7 抗原の細胞株における発現を示す図である。2D7 抗体で各種細胞を染色し、その発現を調べた。（実線：一次抗体なし、点線：2D7 抗体）

図 3 は、2D7 抗体による免疫沈降を示す写真である。NIH3T3, RPMI8226, U266 細胞を可溶化し、2D7 抗体、抗 BST-1 抗体（コントロール）、またはプロテイン G のみで免疫沈降を行い、銀染色で蛋白を検出した。RPMI8226, U266 で 2D7 抗体により特異的に沈降する約 12KD の分子（矢印）が検出された。このバンドを切り出し、ペプチドシーケンスを行った結果、 $\beta$ 2 ミクログロブリンであることが分かった。

図 4 は、スクリーニングの流れを示す図である。プール分け、DNA の調製、ウイルスへのパッケージング、3T3 細胞への感染、FACS によるスクリーニングまで



- 24 -

を一つのスパンとして行った (図 4 A)。四次スクリーニング終了までに約 20 クローンにまで絞った。五次スクリーニングでは、コロニー 64 個をそれぞれ 96 ウェルプレートに植菌し、縦の列、横の列でプールを作りスクリーニングを行った。その結果、12 個の候補クローンが絞れた (図 4 B)。

5 図 5 は、FACS によるスクリーニングの結果を示す図である。図 5 A は二次スクリーニングの結果を、図 5 B は三次スクリーニングの結果を、図 5 C は四次スクリーニングの結果を示している。各プールよりレトロウイルスを調製後 NIH3T3 に感染させ 3 日後に 2D7 抗体で細胞を染色した。スクリーニングごとにプールのサイズを徐々に小さくすることでクローンを絞っていった。

10 図 6 は、FACS によるスクリーニングの結果を示す図である。図 6 A は五次スクリーニングの結果を、図 6 B は最終スクリーニングの結果を示している。五次スクリーニングの結果、3, 4, 6, 8 の列、E, F, G の列に陽性クローンが含まれていることが分かった。12 個の候補クローンをスクリーニングした結果、E の列では 6E が陽性クローンであることが分かった。この 6E の塩基配列を解析した結果 HLA c  
15 lassI A\*6802 をコードしていた。

図 7 は、2D7 抗体添加による細胞への影響を示す図及び写真である。2D7 抗体 (10  $\mu$ g/ml) 添加後、48 時間後に生細胞数を測定した。2D7 抗体を加えても、細胞増殖にほとんど変化が見られなかった (図 7 A)。K562 細胞 (図 7 B)、Jurkat 細胞 (図 7 C)、RPMI8226 細胞 (図 7 D) をそれぞれ抗体添加 24 時間後に観  
20 察した。2D7 抗体は Jurkat に対して細胞凝集を誘導した。

図 8 は、2D7 抗体のクロスリンクによる細胞死誘導を示す写真である。Jurkat 細胞に 2D7 抗体、抗マウス IgG を各組み合わせで作用させ、48 時間後に細胞核を染色した。2D7 抗体と抗マウス IgG を同時に作用させることにより、細胞死による核の断片化が観察された。

25 図 9 は、2D7 Diabody (2D7DB) の配列である。

図 10 A および図 10 B は、2D7 Diabody の構造を示した図である。図 10 C

は COS7 での一過性発現を示した写真である。

図 1 1 A および図 1 1 B は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。

図 1 2 は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。

5 K562 細胞 (図 1 2 A)、Jurkat 細胞 (図 1 2 B) を用いて行った。

図 1 3 は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。  
RPMI8226 細胞 (図 1 3 A)、IL-KM3 細胞 (図 1 3 B)、U266 細胞 (図 1 3 C)、  
ARH77 細胞 (図 1 3 D) を用いて行った。

図 1 4 は、精製 2D7DB の増殖抑制効果を示したグラフである。

10 図 1 5 は、誘導 48 時間後における精製 2D7DB による細胞死誘導を示した図である。  
ARH77 細胞 (図 1 5 A)、Jurkat 細胞 (図 1 5 B)、K562 細胞 (図 1 5 C)、  
HeLa 細胞 (図 1 5 D) を用いて行った。

図 1 6 は、誘導 48 時間後における精製 2D7DB による細胞死誘導を示した図である。  
U266 細胞 (図 1 6 A)、IL-KM3 細胞 (図 1 6 B) を用いて行った。

15 図 1 7 は、2D7DB (2  $\mu$ g/ml) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。  
12 時間から 38 時間における細胞死誘導を調べた。ARH77 細胞 (図 1 7 A)、  
Jurkat 細胞 (図 1 7 B) を用いて行った。

図 1 8 は、2D7DB (2  $\mu$ g/ml) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。  
3 時間から 6 時間における細胞死誘導を調べた。ARH77 細胞 (図 1 8 A)、Ju

20 rkat 細胞 (図 1 8 B) を用いて行った。

図 1 9 は、2D7DB による細胞死に対する Z-VAD-FMK の効果を示した図である。A  
RH77 細胞を用いて、誘導後 16 時間に行った。

図 2 0 は、2D7DB による細胞死に対する Z-VAD-FMK の効果を示した図である。J  
urkat 細胞を用いて、誘導後 16 時間に行った。

25 図 2 1 は、2D7DB による細胞死が DNA の断片化に伴わないことを示した写真である。  
細胞死誘導後 24 時間後に行った。

- 26 -

図 2 2 は、2D7DBの細胞死誘導活性に対するサイトカラシンDの影響を調べた結果を示す図である。ARH77細胞をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDであ  
らかじめ処理しておくことにより、2D7DBによって誘導される細胞死に対して抵抗  
性を示すようになった。

5 図 2 3 は、細胞内のアクチンと核の様子を、免疫染色によって調べた結果を示  
す写真である。ARH77 細胞を図中の条件下で反応させた後、抗アクチン抗体でア  
クチンを（赤）、Hoechst33258 で細胞核を（青）検出した。2D7DB 処理した細胞  
はアクチンが消失していた。

図 2 4 は、2D7 Diabody がヒト骨髓腫マウスモデルにおいて、血清中のヒト IgG  
10 (hIgG) 濃度の上昇を抑制することを示した図である。データは平均+SEM で表  
す。Vehicle 投与群と 2D7 Diabody 投与群との間に、対応の無い t 検定において  
有意差 (\* :  $p < 0.05$ ) が存在した。

図 2 5 は、2D7 Diabody がヒト骨髓腫マウスモデルにおいて、延命効果を有す  
ることを示した図である。Vehicle 投与群と 2D7 Diabody 投与群との間に、一般  
15 化 Wilcoxon 検定において有意差 (\* :  $p < 0.05$ ) が存在した。

図 2 6 は、PBMC に対する 2D7DB の作用を解析した図である。マイトゲンには PH  
A-M (図 2 6 A)、ConA (図 2 6 B) および SAC (図 2 6 C) を用いた。また、図  
2 6 D はマイトゲン非存在下での結果を示し、図 2 6 E は陽性対照 (ARH77) での  
結果を示す。上から順に、2D7DB 非添加、3 時間添加、24 時間添加での結果を示  
20 す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施  
例に制限されるものではない。

#### 25 [1] 細胞株

ヒトミエローマ細胞株 (RPMI8226, K562, ARH77)、ヒト T 細胞白血病細胞株

- 27 -

(Jurkat)、FDC-P1、HCI-16、及び、2D7 ハイブリドーマ細胞株 (徳島大学由来) は 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製) で、ヒトミエローマ細胞株 (IL-KM3、U266) は同培地にそれぞれ 2 ng/ml IL-6 (R & D 社製) を添加した培地で、Ba/F3 は同培地に 2 ng/ml IL-3 (R & D 社製) を添加した培地で培養した。また COS7、293T、HeLa、NIH3T3 及び BOSC23 は 10% FCS を含む DMEM 培地 (GIBCO BRL 社製) で、CHO は  $\alpha$ -MEM 培地 (GIBCO BRL 社製) + 5% FCS または 10% FCS で培養した。

## [2] pMX2 ベクターの作製

GFP 遺伝子をウイルス粒子中にパッケージングするレトロウイルスベクター pMX2-X-GFP の GFP 遺伝子領域を EcoRI-SalI で切り出し除いた。この領域に、BstXI site を配列上に持つアダプター (図 1) (ABI DNA synthesizer で合成後、*in vitro* でアニールさせ使用) を挿入し、pMX2 とした。

## [3] cDNA ライブラリーの作製

RPMI8226 細胞より、Trisol (GIBCO BRL 社製) を用いて定法により Total RNA を精製した。さらに、この Total RNA 200  $\mu$ g から、 $\mu$ MACS mRNA Isolation kit (Miltenyi Biotec 社製) を用い添付されたマニュアル書に従って mRNA を精製した。3.6  $\mu$ g の mRNA を鋳型にしてランダムヘキサマー (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis; Invitrogen) を用いて cDNA を合成した後、BstXI アダプター (Invitrogen 社製) を両末端に連結した。この cDNA を、BstXI で切断した pMX2 ベクターに挿入し、ELECTRO MAX DH10B (GIBCO BRL 社製) にエレクトロポレーション法により導入した (2.5 KV, 200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F)。その後、1 ml の SOC を加え 37°C で一時間インキュベートし、40% グリセロール/ LB+Amp 1 ml を加え、一部をタイターチェックに使用し、残りは -80°C に保存した。得られたライブラリーを、1 ウェルあたり 1000 クローンになるように 96 穴プレート 2 枚に 200  $\mu$ l/ウェル (7% DMSO/LB+Amp) で巻き込み、37°C で一晩培養した。このプレートの 4 ウェル分 (4000 クローン分) をアンピシリン入り LB 培地 (4 ml) 一本に植菌し

- 28 -

た。これを一つのプールとし、残りのウェルについても同様の操作を行い、最終的にプレート一枚より 24 プールを作製した。各プールを 37℃で一晩培養後 DNA を調整し (QIAGEN 社製)、パッケージング細胞へのトランスフェクションに用いた。植菌に使用したプレートは二次スクリーニングで使用するまで -80℃に保存した。

5 た。

#### [4] 抗体の精製

2D7 抗体は、徳島大から送付された腹水 0.5 ml を Protein A Hi Trap Affinity column (Amersham Pharmacia 社製) に吸着させたのち、IgG 画分を 0.1 M Sodium Citrate, pH3.0 で溶出し、回収した。これをセントリコン (YM-10; ミリポ  
10 ア) で濃縮したのち PBS にバッファー置換を行い、最終的にトータル 5.34 mg の抗体を得た。これらを分注して -20℃に保存した (濃度 0.89  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。

#### [5] FACS

付着細胞の場合は 1 mM EDTA/PBS で細胞をはがし、浮遊細胞の場合は遠心回収後 FACS Buffer (2.5%FCS, 0.02%NaN<sub>3</sub>/PBS) に懸濁し、2D7 抗体 (最終濃度 10  
15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む buffer (5%FCS/ PBS) 中に氷上で一時間おいた。FACS Buffer で洗浄後、FITC-抗マウス IgG (Immunotech 社製) 溶液中 (1:150, 50  $\mu\text{l}$  FACS Buffer) で、氷上で 30 分間反応させ、これを FACS Buffer で 2 回洗浄後、ELITE (Coulter 社製) で解析を行った。

#### [6] レトロウイルス感染

##### 20 (i) レトロウイルスパッケージング

レトロウイルスパッケージング細胞である BOSC23 細胞は、トランスフェクション前日に  $6 \times 10^5$  cells/ウェル 2 ml で 6 ウェルプレートに撒いておいた。トランスフェクションは以下の手順で行った。各プール由来プラスミド DNA 1  $\mu\text{g}$  に対して FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche 社製) 3  $\mu\text{l}$  を混ぜ室温で 20 分置  
25 いた後、前日撒いておいた BOSC23 細胞の培地中に加えた。その後 37℃で 48 時間培養後培地を回収した。3000 回転で 5 分遠心し死細胞を除いた培養液をウイルス

- 29 -

液として使用した。

(ii) ウイルス感染

前日  $1 \times 10^5$  cells/ウェル 2ml で6 ウェルプレートに撒いた NIH3T3 細胞を、ポリブレン (hexadimethrine bromide; sigma)  $10 \mu\text{g/ml}$  を添加したウイルス液 1  
5 ml 中で 24 時間培養した。その後フレッシュな培地 1.5 ml を加えさらに 48 時間培養を行い、その後遺伝子発現を FACS により解析した。

[7] 免疫沈降

細胞を lysis buffer ( $0.5\%$  Nonidet P-40,  $10 \text{ mM}$  Tris, pH 7.6,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $5 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride,  $5 \mu\text{g/ml}$  aprotinin) で溶  
10 解したのち、遠心して不溶化蛋白を除き cell lysate とした。これに、2D7 抗体  $1 \mu\text{g}$  を加え  $4^\circ\text{C}$  で 4 時間インキュベートし、引き続き magnetic protein G (Biomag 社製) を加えさらに 1 時間インキュベートした。その後免疫複合体を lysis buffer で 3 回 wash し SDS-PAGE を行った。このゲルを添付のマニュアルに従って銀染色 (第一化学) した。一方ペプチドシーケンサーのために、SDS-PAGE 後のゲ  
15 ルを ProBlott (Applied Biosystems 社製) に転写し、クマシーブルー染色液 ( $0.1\%$  coomassie blue R-250 in  $40\%$  MeOH/  $1\%$  acetic acid) で一分間染色した。 $50\%$  MeOH で数回洗浄した後目的のバンドを切り出し、 $1 \text{ ml}$  DDW で 5 回洗浄した後真空乾燥し、ペプチドシーケンサーにかけた。

[8] 2D7 抗体を用いた細胞増殖アッセイ

20 各細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/ml で PMA ( $50 \text{ ng/ml}$ ; GIBCO BRL), PHA ( $10 \mu\text{l/ml}$ ; GIBCO BRL) 存在下または非存在下で撒いた。そこに 2D7 抗体 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加または非添加後 48 時間培養した。培養後、細胞の形態変化を顕微鏡下で観察した。生細胞数測定は、WST-8 (生細胞数測定試薬 SF; ナカライテスク) を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間培養後、 $\text{OD}_{450}$  を測定することで相対的な生細胞  
25 数を測定した。

[9] クロスリンクによる細胞死誘導

- 30 -

Jurkat 細胞を  $8 \times 10^5$  cells/ウェルで 24 ウェルプレートに撒き、2D7 抗体存在下 (5  $\mu$ g/ml) または非存在下で、さらに抗マウス IgG (Fc) 抗体 (Cappel 社製) を 10  $\mu$ g/ml 添加した。48 時間後に細胞を回収し、PBS で洗浄後メタノールを 70% 濃度になるように加え、 $-20^\circ\text{C}$  で 15 分置いた。細胞を FACS Buffer で数回洗浄後、Hoechst33258 を 10  $\mu$ g/ml 濃度で添加し室温で 30 分インキュベートした。再度 FACS Buffer で細胞を洗浄し、スライドガラスの上に細胞を滴下し蛍光顕微鏡で核の様子を観察した。

#### [10] 2D7 可変領域のクローニング

2D7 ハイブリドーマ (徳島大学より供与) より total RNA を Trizol を用いて定法により精製した。この RNA 3  $\mu$ g を鋳型にして、SMART RACE cDNA Amplification kit (CLONTECH 社製) を用い、添付のマニュアルに従って cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして heavy chain、light chain の可変領域を以下のプライマーを用いて PCR 法により増幅を行った。

heavy chain: 5' - CAGGGGCCAGTGGATAGACTGATG (配列番号: 9)

15 light chain: 5' - GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG (配列番号: 10)

増幅された各可変領域をコードする cDNA は pCR-TOPO vector (Invitrogen 社製) にサブクローニングし塩基配列 (配列番号: 1 および 3) を決定した。

#### [11] 2D7 Diabody 発現ベクターの作製

各可変領域 cDNA をサブクローニングしたプラスミドを鋳型にして Heavy chain、及び、Light chain の可変領域 (VH, VL) をそれぞれ以下のプライマーにより増幅した。

Heavy chain

2D7DB-H1: 5' - CCTGAATTCCACCATGCGATGGAGCTGGATCTTTC (配列番号: 11)

2D7DB-H2: 5' - AATTGGCTACCGCCTCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCT (配列番号: 12)

25 12)

Light chain

- 31 -

2D7DB-L1: 5'-TCCTCAGGTGGAGGCGGTAGCCAAATTGTTCTACCCAGTCGCCAGC (配列番号:  
13)

2D7DB-L2: 5'-ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAGTCTTTTATCTCCAACCTTTGTC  
CCCGAGCC (配列番号: 14)

- 5 これにより増幅した VH、VL の各 cDNA を一つのチューブに混合しさらに PCR 反応を行った。この PCR 産物を鋳型にして、今度は 2D7DB-H1、2D7DB-L2 をプライマーにして再度 PCR 反応を行い、VH と VL が 5 mer のリンカーをはさんで連結した cDNA (配列番号: 5) を合成した。この cDNA を EcoRI-NotI 切断し、動物細胞発現ベクター pCXND3 の EcoRI-NotI 間に挿入した。塩基配列を確認し 2D7 Diabody 発
- 10 現ベクター pCXND3-2D7DB の構築を終了した。

[12] COS7 細胞での一過性発現

- pCXND3-2D7DB、あるいはコントロールとして空のベクター 2  $\mu$ g に対してトランスフェクション試薬 (LT-1, MIRUS 社製) 6  $\mu$ l を添付のマニュアルに従って混合し、無血清培地 (OPTI-MEM, GIBCO BRL) に培地交換した COS7 細胞 (前日に 1
- 15  $\times 10^5$  cells/ウェルで 6 ウェルプレートに撒いたもの) に添加した。5 時間後に血清 200  $\mu$ l を添加し 2 日から 3 日間培養した。その後培地を回収し、遠心により死細胞を除去した培養上清を細胞傷害活性の検出実験に用いた。

- 一方培養上清中の 2D7DB の発現はウエスタンブロットにより確認した。すなわち、培養上清の一部に等量の 2XSDS-PAGE Sample buffer を加え、また細胞は lysis buffer (0.5%Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA)
- 20 を加えて溶解したのち、遠心して不溶化蛋白を除き cell lysate を調整しこれに等量の 2XSDS-PAGE Sample buffer を加えた。各サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、抗 FLAG 抗体で 2D7 Single chain の発現を検出した。

[13] 2D7 Diabody 産生発現細胞株の樹立

- 25 PvuI で切断し直鎖化した pCXND3-2D7DB 20  $\mu$ g を CHO 細胞 (DXB11 株) に以下のようにエレクトロポレーション法により導入した。



- 3 2 -

CHO 細胞を ice-cold PBS で 2 回洗浄した後  $1 \times 10^7$  cells/ml になるように PBS に懸濁した。これに 20  $\mu$ g の上記プラスミドを混合し、電気パルス (1.5 KV, 25  $\mu$ FD) を与えた。適当な割合で細胞を希釈し 10 cm dish に撒きこみ、終濃度 500  $\mu$ g/ml G418 (GIBCO BRL 社製) 存在下で培養を行った。生育したコロニーを ~30  
5 クローンほどピックアップし、それら培養上清中の Diabody の発現量をウエスタンブロットにより調べた。最も発現の高かったクローンを 5 nM MTX を含む核酸フリーの MEM  $\alpha$  培地に拡大後、これを高産生細胞株としてストックした。

#### [ 1 4 ] 2D7 Diabody の大量精製

T-125 フラスコでサブコンフルエントの 2D7DB 高産生 CHO 細胞株を Trypsin-EDT  
10 A ではがした後ローラーボトル (MEM  $\alpha$  without nucleotide + 5%FCS 250 ml) に移した。4 日後に培養液を除去し PBS で 2 回洗浄した。その後、無血清化するために CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO BRL 社製) 250 ml に置換し 3 日間培養を行った後培養上清を回収した。遠心によって死細胞を除去した後フィルターを通してこれを精製に用いた。

15 Single chain Fv の精製は以下のとおり行った。まず、Anti-Flag M2 カラムに回収した培養上清を Apply し吸着させた。これを Buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.01%Tween 20) で wash した後、Buffer B (100 mM Glycine H3.5, 0.01%Tween 20) で Single chain Fv を溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度 25 mM になるように Tris-HCl pH8.0 で中和した。これをひき続き Superdex  
20 x200HR (26/60) カラムによるゲルろ過精製に用いた。0.01%Tween 20 を含む PBS 中で Single chain Fv の dimer fraction を回収した。回収したサンプルの一部を SDS 電気泳動および銀染色を行い、目的の蛋白が精製されていることを確認した後これを濃縮し、2D7 Diabody 精製標品とした。

#### [ 1 5 ] 2D7 Diabody による細胞死誘導実験

25 各種血球系細胞株の場合は、 $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/ウェルになるように 24 ウェルプレートに細胞を撒いた。これに、精製した 2D7DB を、あるいは 2D7DB を一過性に

- 3 3 -

発現させた COS7 の培養上清を加え細胞死誘導を行った。2D7DB を一過性に発現させた COS7 培養上清を用いた場合はその培養上清の濃度が 50% になるように加えた。各ウェルとも培地の量は 0.8~1 ml/ウェルで行った。Jurkat 細胞に刺激を加える場合は、2D7DB の添加時に Con A (WAKO 社製) を終濃度 2  $\mu$ g/ml になるよう

5 に同時に添加した。

付着細胞 (HeLa) の場合は、 $2 \times 10^5$  cells/ウェルになるように 6 ウェルプレートに細胞を撒き一晚培養することで細胞を付着させた。その後培養液中に精製した 2D7DB を添加した。

2D7DB を添加し数時間から数日経った後、浮遊細胞はそのまま細胞を回収し、  
10 付着細胞は 1 mM EDTA/PBS で細胞をはがして回収した後、ice-cold PBS で細胞を wash し、添付のマニュアルに従ってアポトーシスマーカーである Annexin V、及び、死細胞マーカーである PI で細胞をラベルした (TACS AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit, TREVIGEN Instructions 社製)。その後、flow cytometry を用いて染色された細胞の割合を測定した (EPICS ELITE, COULTER)。

15 [16] Actinomycin D による細胞死誘導

各種血球系細胞を  $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/ウェルになるように 24 ウェルプレートに撒いた。アポトーシスの初期過程を阻害する目的でカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK, プロメガ) を終濃度 50  $\mu$ M で添加し 2.5 時間インキュベートした後、細胞死誘導を行った。Actinomycin D による細胞死誘導では Actinomycin D (sigma 社製) を  
20 1  $\mu$ g/ml (Jurkat)、あるいは 5  $\mu$ g/ml (ARH77) 添加し、2D7DB による細胞死誘導では精製 2D7DB を 2  $\mu$ g/ml になるように添加した。細胞死誘導から 16 時間後に細胞を回収し、Annexin V、PI で細胞を染色した。

[17] 2D7 Diabody を用いた細胞増殖アッセイ

各細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \sim 2 \times 10^4$  cells/ウェルの細胞濃度で撒いた。  
25 そこに 2D7DB を適当な濃度になるように添加し 3 日培養後細胞数の測定を行った。生細胞数の測定は、WST-8 を用いて行った。すなわち本試薬を 10  $\mu$ l/ウェルで細

- 3 4 -

胞に添加し 37°C で 1.5 時間培養後、分光光度計で  $OD_{450}$  を測定することで相対的な生細胞数を測定した。増殖抑制率は、 $(1 - (OD_{450} \text{ of 2D7DB treated cells} / OD_{450} \text{ of 2D7DB untreated cells})) \times 100$  により算出した。

[18] DNA の断片化の検出

- 5 ARH77、Jurkat 細胞を  $2 \times 10^6$  cells/ウェルの細胞濃度になるように 6 ウェルプレートに撒き、それぞれのウェルに精製 2D7DB は終濃度  $2 \mu\text{g/ml}$  で、Actinomycin D は終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  (ARH77)、あるいは  $5 \mu\text{g/ml}$  (Jurkat) になるように添加することで細胞死誘導を行った。また何も添加しない 1 ウェルをコントロールとした。24 時間培養後細胞を回収し PBS で細胞を一回洗浄し、lysis
- 10 buffer (10 mM Tris pH7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) で溶解した。引き続き遠心することで不溶性蛋白を除いた後、これを RNase A, Proteinase K 処理した。その後この一部をアガロースゲルで電気泳動を行い、クロマチン DNA の断片化を検出した。

[19] サイトカラシン D による細胞死誘導阻害

- 15 ARH77細胞を、 $5 \times 10^5$  cells/ウェル細胞濃度になるように 24 ウェルプレートに播き、サイトカラシン D (sigma 社製) を終濃度  $20 \mu\text{g/ml}$  になるように加えた。またエタノールのみを加えたウェルをコントロールとした。1 時間培養後、精製した 2D7DB を各濃度 (0, 200, 500, 1000 ng/ml) で加え、さらに 4 時間培養を行った。その後細胞を回収し、PI で染色することで死細胞の割合を検出した。

20 [20] 2D7DB 処理した細胞の抗アクチン抗体を用いた免疫染色

サイトカラシン D 処理/未処理の ARH77 細胞に、2D7DB を  $1 \mu\text{g/ml}$  濃度で加え、37°C で 15 分培養した後、細胞をサイトスピンによりスライドガラス上に付着させた。-20°C のメタノールに 15 分浸して細胞を固定した後、ブロッキングバッファー (3% BSA/PBS) で 4°C 1 時間ブロッキング処理を行った。その後、1% BSA/PBS 中

25 で 100 倍希釈した CY3 標識抗アクチン抗体 (sigma 社製) を室温で 1 時間反応させた後、引き続いて Hoechst 33258 で細胞核を染色した。PBS で数回洗浄した後、共焦点

- 3 5 -

レーザー走査型顕微鏡(オリンパス)で細胞を観察した。

〔実施例 1〕 各種細胞株における 2D7 抗原の発現解析

cDNA 発現ライブラリー作製のための source にすべき細胞株、および、宿主にすべき細胞株を決定するため、各種動物細胞における 2D7 抗原の発現を FACS により解析した (図 2 A および図 2 B)。その結果、ヒト由来血球系細胞ではリンパ性腫瘍細胞株 RPMI8226, U266, 及び、Jurkat で 2D7 抗原の非常に強い発現が観察されたが、K562 では発現が弱いことが分かった。マウス由来血球細胞である Ba/F3, FDC-P1, HCI-16 では種の違いによるためか発現が非常に弱かった。付着細胞では、COS7, 293T, HeLa においても発現が認められた。マウス NIH3T3 細胞では、  
10 ほとんど発現が見られなかった。

以上の発現パターンから、発現クローニングに使う cDNA ライブラリーの SOURCE は RPMI8226 細胞が、また発現ライブラリーを導入してスクリーニングに使用する宿主細胞は NIH3T3 細胞が適切であると判断した。

〔実施例 2〕 2D7 抗原のクローニング

15 [1] 蛋白質からのクローニング

2D7 抗原を発現している RPMI8226 細胞、U266 細胞、および、2D7 抗原を発現していない NIH3T3 細胞より cell lysate を調製し、2D7 抗体で免疫沈降を行った。その結果、RPMI8226, U266 細胞で特異的に precipitate される分子 (~12kD) が確認された (図 3)。この分子は 2D7 抗体による western blot では検出されない  
20 が、少なくとも 2D7 抗体では再現良く precipitate されるので、2D7 抗原そのもの、あるいは、2D7 抗原との共沈分子であることが強く予想された。

そこで、このバンドをクマシー染色した後切り出し、ペプチドシーケンスを行った。その結果、この 12kD の分子の正体は  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2M$ ) であることが分かった。 $\beta 2M$  は HLA class I と非共有結合で会合するクラス II MHC 蛋白質複合体の一つであることから、 $\beta 2M$  は 2D7 抗体により HLA 複合体として共沈してきたものと考えられる。HLA class I は、抗原提示に必要な  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  ドメイン、  
25

- 36 -

及び、 $\beta$ 2M と結合する  $\alpha$ 3 ドメインから成る。2D7 抗体が  $\beta$ 2M 分子を共沈できることから、2D7 抗体は HLA class I の  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 ドメインをエピトープとして認識していると予想される。

## [2] 遺伝子の発現クローニング

- 5 2D7 抗原発現細胞 RPMI8226 より精製した mRNA からランダムヘキサマーにより cDNA を合成した。これをレトロウイルスベクター pMX2 に挿入し、レトロウイルス発現ライブラリーを作製した。ライブラリーのタイターを調べた結果、トータルで  $6 \times 10^6$  クローンを含んでいることが分かった。また、このライブラリーより
- 10 24 個のクローンをランダムにピックアップしコロニーPCRによりインサートサイズを調べた結果、cDNA average length はおよそ 1.5kb であることが分かった。従って、作製した発現ライブラリーは発現クローニングに十分使用可能であると判断した。

- 図 4 A および図 4 B に、以下のスクリーニングの流れを示す。一次スクリーニングでは 4000 個の independent なクローンを 1 プールとして 24 プール (96000 ク
- 15 ローン相当) を作製し、各プラスミドを BOSC23 細胞にトランスフェクトすることでレトロウイルスにパッケージングした。その後得られた各プール由来ウイルスを NIH3T3 細胞に感染させた。感染 3 日後に細胞をはがし、2D7 抗体で染色した後 FACS により発現解析を行った。その結果、空ベクター由来のウイルス (コントロール) を感染させた NIH3T3 細胞と比較して 2D7 陽性細胞が認められたプールが 2
- 20 4 プール中 3 プールで認められた (プール 4、13、21)。

- 次に一次スクリーニングで陽性だったプール 4、プール 13 を 1000 個の independent なクローンからなるプール 4 個に分割し二次スクリーニングを行った。その結果、各プールから一つずつ、明らかな陽性プールが認められた (図 5 A、プール 4-4、プール 13-1)。さらにプール 13-1 を 160 個の independent なクローン
- 25 からなるプール、21 個に分割し、三次スクリーニングを行い、二つの陽性プール (図 5 B、13-1-11、13-1-21) を同定した。続いてプール 13-1-11 を 20 個のクロ

- 37 -

ーンからなるプール 8 個に分け四次スクリーニングを行い、陽性プール (図 5 C、13-1-11-5) を得た。

このプールを LB プレートに広げ 64 個のコロニーを一つずつ拾いそれぞれを 96 ウェルプレートに 1 ウェルずつ植菌した。縦の列 8 クローン分を 1 プールとして  
5 8 プール (1~8) を、また横の列 8 クローン分を 1 プールとして 8 プール (A~H) を作製し、五次スクリーニングを行った。その結果、プール 3, 4, 6, 8 及びプール E, F, G が positive であったためこの結果から 12 個の positive 候補クローンを絞ることができた (図 6 A)。この 12 個について FACS を行い、最終的に 4 つの  
10 positive クローン (3F, 4G, 6E, 8G) が 2D7 抗体に認識される単一クローンとして同定された (図 6 B)。

このクローンのインサート部分のシーケンスを読んだ結果、4 つとも Human MHC class I HLA-A-6802 の全長 cDNA 配列であることが分かった。

HLA-A は数十種類ものハプロタイプに分類されている。今回のクローニングの結果、HLA class I の A\*6802 というハプロタイプが 2D7 抗原として同定されたが、  
15 2D7 抗体はかなり広範な細胞種を認識することから、遺伝子ソースとして使った RPMI8226 細胞での HLA class I のハプロタイプがたまたま A\*6802 だったというだけであって、2D7 抗体は全てのハプロタイプを含む HLA class I 分子を認識する抗体であると考えられた。

### 【実施例 3】 増殖抑制効果についての検討

20 2D7 抗体が細胞殺傷作用を有しているかを、数種類の leukemia 細胞株 (K562, Jurkat, RPMI8226) を使って調べてみた。なお、これら三株での 2D7 抗原の発現量は、K562 (弱陽性), Jurkat, RPMI8226 (強陽性) であった。

K562, Jurkat 細胞を PHA と PMA 存在下、非存在下で撒き、そこに 2D7 抗体を 10  $\mu$ g/ml で加えた。24 時間後に細胞を観察した結果、2D7 弱陽性である K562 細胞  
25 では 2D7 抗体の有無でその形態に目立った差は認められなかったが、2D7 を強く発現している Jurkat 細胞では 2D7 抗体の添加により著大な細胞凝集が観察された

- 38 -

(図 7 B および 図 7 C)。しかしながら、2D7 抗体添加による増殖抑制は観察されなかった (図 7 A)。また PHA, PMA 刺激により活性化させた Jurkat 細胞においても 2D7 による増殖抑制は同様に見られなかった。

さらに、2D7 強陽性細胞である RPMI8226 細胞においては予想に反して 2D7 抗体を添加しても、細胞の形態、増殖に目立った影響を与えなかった (図 7 D)。

次に、2D7 抗体にさらに抗マウス IgG (Fc) 抗体を加え、抗体をクロスリンクさせることで細胞殺傷効果が見られるか調べた。Jurkat 細胞に 2D7 抗体存在下、非存在下で、さらに抗マウス IgG を加え培養を行い、48 時間後、細胞核を Hoechst33258 で染色し死細胞に特長的な細胞核の断片化が認められるか観察した (図 8)。

10 その結果、Jurkat 細胞において、2D7 をさらに抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されていることが分かった。

【実施例 4】 2D7 抗体可変領域をコードする cDNA のクローニングおよび予想される Diabody の構造

マウス IgG2b の heavy chain, light chain の定常領域に対するプライマーを作製し、5' RACE 法により 2D7 可変領域をコードする DNA のクローニングを行った。

15 得られた PCR 産物の塩基配列は配列番号：1 および 3 に示したとおりである。

続いてこの配列をもとに single chain の構築を行った。図 9 および 図 10 A に示すように 2D7 single chain は、heavy chain のリーダーシーケンス、heavy chain の可変領域、そして 5mer のリンカー (GGGGS) をはさんで light chain の可変領域、その後ろに flag-tag をコードする cDNA (配列番号：5) から構成される。2D7 Diabody はこの single chain が dimerize することで図 10 B に示すような構造を形成すると考えられる。

20

【実施例 5】 2D7 Diabody の細胞傷害活性解析

(i) COS7 で一過性に発現させた 2D7 Diabody の傷害活性

25 2D7 Diabody 発現ベクターを COS7 細胞にトランスフェクトし、3 日後に培養上清を回収した。培養上清、及び cell lysate を SDS-PAGE し抗 Flag-tag 抗体で we

- 39 -

stern blot を行った結果、培養上清中に 2D7 single chain が分泌されていることが確認された (図 10 C)。

この培養上清を Jurkat 細胞に 50% の割合で添加し数日後に細胞を PI、及び、Annexin V で染色することで死細胞の割合を測定した。Jurkat 細胞は、抗 BST-1 抗体、2D7 抗体 (各 5  $\mu$ g/ml) を添加しただけではアポトーシスマーカーに大きな変動は認められなかった。また、ベクターのみをトランスフェクトした COS7 の培養上清でも特に変化は認められなかった。一方、2D7DB を発現させた COS7 の培養上清を加えた Jurkat 細胞では、明らかな細胞死誘導が認められた (図 11 A および図 11 B)。

- 10 次に、この 2D7DB が HLA class I A 特異的に作用していることを調べる目的で、HLA class I A を発現していないことが知られている K562 細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、2D7DB は Jurkat 細胞に対しては細胞死誘導活性を認めたものの、K562 細胞に対しては全く影響を及ぼさなかった (図 12 A および図 12 B)。このことから 2D7DB の細胞死誘導活性はそのエピトープである HLA class
- 15 I A を標的にした作用であることが強く支持された。また、Jurkat 細胞の 2D7DB に対する感受性は con A で刺激した細胞の方が若干ではあるが高いような傾向が各データから認められた。

- 次に他のミエローマ細胞株に対する 2D7DB の作用を解析した。RPMI8226, IL-KM 3, U266, ARH77 をベクターのみをトランスフェクトした培養上清 (コントロール)、あるいは 2D7DB 発現 COS7 培養上清とインキュベートし、二日後に Annexin V, PI で二重染色し Flow cytometer で解析した。その結果いずれの細胞も 2D7DB とのインキュベートにより顕著に細胞死が誘導されることが明らかになった (図 13 A ~ 図 13 D)。

(ii) 精製した 2D7DB の細胞傷害活性

- 25 精製した 2D7DB の各種細胞株 (RPMI8226, ARH77, U266, Jurkat) に対する増殖抑制効果について解析した。2D7DB を 0, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu$ g/ml で添加し 3 日後



- 40 -

に細胞数を測定した。その結果、これらの細胞に対して濃度依存的に細胞増殖を抑制することが分かった（図 1 4）。

次に、精製 2D7DB を添加し 48 時間後に細胞死マーカーである PI, Annexin V で染めて解析を行った。その結果、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB を用いた時の結果と同様に Jurkat、ARH77 に対して濃度依存的に細胞死を誘導し、K562 にはまったく影響を与えないことが明らかになった（図 1 5 A～図 1 5 C）。また U266, IL-KM3 に対しても 2D7DB 添加 48 時間後に著しい細胞死誘導活性が認められた（図 1 6 A および 図 1 6 B）。

一方、付着細胞である HeLa 細胞に対しては、この細胞は 2D7 抗体で非常によく染色されるにも関わらず、同条件で 2D7DB は全く影響を及ぼさなかった（図 1 5 D）。このことから、2D7DB は血球系細胞など浮遊細胞にのみ特異的に作用する可能性が示唆された。

続いて、2D7DB による細胞死誘導活性がどれくらいの時間で誘導されるか解析した。ARH77, Jurkat 細胞に 2D7DB を 2  $\mu$ g/ml で添加し、12、24、38 時間後に細胞を回収し、細胞死マーカーで染色した。その結果、いずれの細胞も 12 時間後で既に細胞死が誘導されていることが判った（図 1 7 A および 図 1 7 B）。そこで、さらに早い時間（3 時間、6 時間）における細胞死誘導を調べた。驚いたことに 2D7DB は添加してから少なくとも 3 時間以内に細胞死を誘導することが実験から明らかになった（図 1 8 A および 図 1 8 B）。これらの結果から 2D7DB は非常に強力な細胞死誘導活性を有することが強く支持された。このように 2D7DB は強力に細胞死を誘導するので、短い血中半減期でも十分な薬効が期待できる。さらに、whole 抗体が仮に強力な細胞死誘導活性を有した場合には、血中半減期の長さから安全性の問題が懸念されるが、Diabody 化することにより、そのような問題もクリアされることが考えられる。

次に、2D7DB による細胞死がカスパーゼの活性化を伴って引き起こされる、いわゆるアポトーシスによるものかどうかについて解析を行った。図 1 9、図 2 0

- 41 -

で示すように ARH77, Jurkat 細胞をアポトーシス誘導剤である Actinomycin D で処理し 16 時間後に Annexin V, PI で細胞を染色すると顕著にアポトーシスが誘導された。この条件下であらかじめ細胞をカスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK で 2.5 時間前処理すると Actinomycin D によるアポトーシスは抑制された。ところが、5 2D7DB によって誘導される細胞死は Z-VAD-FMK による前処理を行ってもまったく阻害されなかった。これらの結果から、2D7DB はカスパーゼを介した通常のアポトーシスの機構とは異なる別の機構によって細胞死を誘導していることが明らかになった。

さらにこのことを確認するため、アポトーシスに伴う最も特徴的生化学的变化として知られているクロマチン DNA の断片化に関しても解析を行った。

ARH77, Jurkat 細胞を 2D7DB (2  $\mu$ g/ml)、あるいは Actinomycin D で処理し 24 時間後に DNA を回収し、電気泳動を行った (図 21)。その結果、アポトーシス誘導剤である Actinomycin D 処理した細胞はいずれもアポトーシスの特徴である DNA の断片化が誘導されていたが、その一方で、2D7DB 処理した細胞では完全に細胞死を誘導しうる濃度の 2D7DB を添加しているにも関わらず DNA の断片化は全く認められなかった。この結果からも、2D7DB による細胞死は、アポトーシスの特徴を伴わない未知の細胞死であることが強く支持された。

以上の結果より 2D7DB による細胞死はこれまで知られている細胞死誘導機構とは異なる経路を介して引き起こされていることが分かった。そこで、2D7DB による細胞死誘導のメカニズムを明らかにするため、さらに解析を行った。これまでの実験から、細胞に 2D7DB を反応させると細胞膜が破壊されている様子が顕微鏡下でしばしば観察されていた。このことから、2D7DB がアクチン骨格系に何らかの影響を及ぼしていると推測した。その可能性に関して検討するため、アクチン重合阻害剤 (サイトカラシン D) を細胞に作用させ、2D7DB の細胞死誘導活性に対する影響について解析を行った。

ARH77 細胞に サイトカラシン D (20  $\mu$ g/ml) を、またはエタノールのみ (コントロール

- 42 -

ル) を添加し、1時間後に2D7DBを各濃度で加えた。2D7DB添加から4時間インキュベート後に細胞を回収し、PI染色を行い死細胞の割合を測定した(図22)。その結果、サイトカラシンDであらかじめ細胞を処理することにより、2D7DBに対する感受性が消失することが分かった。この結果から、2D7DBはその標的分子である HLA-classIAに結合することで、アクチンなど細胞骨格系に何らかの作用を及ぼし細胞死を誘導することが示唆された。

そこで、2D7DBを作用させた細胞をアクチン抗体で染色し、2D7DBの添加による細胞骨格系の動態変化について視覚的な解析を行った。ARH77細胞に2D7DBを作用させ15分後にメタノールで固定し細胞内のアクチン(赤)の様子を免疫染色により調べた(図23)。その結果、2D7DB非処理の像に比べて、2D7DBにより細胞内アクチン骨格系が著しく破綻している様子が観察された。

以上の結果から、2D7DBによる細胞死は、HLA classIAに結合した2D7DBが細胞内アクチン骨格系を破壊することで引き起こされている可能性が強く示唆された。これは、これまで報告されていない、全く新しいタイプの細胞死誘導機構である。

#### 15 [実施例6] 2D7 diabody のヒト骨髓腫モデル動物での薬効試験

##### (1) ヒト骨髓腫マウスモデルの作製

ヒト骨髓腫マウスモデルは以下のように作製した。ARH77細胞(ATCC)を10%ウシ胎児血清(GIBCO BRL社製)を含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社製)で $2.5 \times 10^7$ 個/mLになるように調製し、あらかじめ前日抗アシアロ GM1 抗体(和光純薬社製) 0.2 mg を腹腔内投与した SCID マウス(オス、6週齢、日本クレア)に上記 ARH77 細胞懸濁液 200  $\mu$ L ( $5 \times 10^6$  個/マウス) を尾静脈より注入した。

##### (2) 投与抗体の調製

2D7diabody を投与当日、濾過滅菌した PBS(-) を用いて、0.8 mg/mL になるように調製し、投与試料とした。

##### 25 (3) 抗体投与

(1) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルに対し、ARH77 細胞移植後 1 日目よ

- 43 -

り、1日2回、3日間、上記(2)で調製した投与試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照(vehicle)として、濾過滅菌したPBS(-)を同様に1日2回、3日間、10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。抗体投与群は1群7匹、vehicle投与群は1群8匹で行った。

5 (4) マウス血清ヒトIgG定量法

マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生するヒトIgGの定量は、以下のELISAで行った。0.1%重炭酸緩衝液(pH9.6)で1  $\mu$ g/mLに希釈したヤギ抗ヒトIgG抗体(BIOSOURCE社製)100  $\mu$ Lを96ウェルプレート(Nunc社製)に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階  
10 希釈したマウス血清あるいは標品としてヒトIgG(Cappel社製)100  $\mu$ Lを添加し、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体(BIOSOURCE社製)100  $\mu$ Lを加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550(BioRad社製)を用いて405 nmの吸光  
15 度を測定し、標品のヒトIgGの吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒトIgG濃度を算出した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

2D7diabodyのヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果については、当該骨髓腫細胞が産生するヒトIgG(Mタンパク質)のマウス血清中の量の変化、及び  
20 生存期間で評価した。マウス血清中のヒトIgG量の変化については、ARH77細胞移植後24日目に血清を採取し、上記(4)で述べたELISAを用いてヒトIgG量を測定した。その結果、Vehicle投与群では、血清ヒトIgG(Mタンパク質)量が約74  $\mu$ g/mLまで上昇しているのに対し、2D7diabody投与群では対照群に比べ有意に低く( $P < 0.005$ , 対応のないt検定)、2D7diabodyがARH77細胞の増殖を非常に  
25 強く抑制していることが示された(図24)。一方、生存期間についても図25に示すとおり、2D7diabody投与群ではvehicle投与群と比較して有意な生存期間

- 4 4 -

の延長が認められた。

以上より、2D7diabody がヒト骨髓腫マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。本発明の 2D7diabody の抗腫瘍効果は、当該抗体が有する細胞死誘起作用に基づくと考えられる。

5     【実施例 7】 PBMC に対する 2D7DB の作用解析

ヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC)に対する 2D7DB の作用を解析した。健康成人ボランティアの末梢血より比重遠心分離にて PBMC を精製した。この PBMC をマイトゲン存在下または非存在下で 24 穴プレートに  $5 \times 10^5$  cells /1 mL /ウェルずつ播いた。マイトゲンにはフィトヘマグルチニン M (P  
10   HA-M、Roche Diagnostics、終濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ )、コンカナバリン A (ConA、Wako、終濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ )、SAC (Pansorbin Cells、Calbiochem、終濃度 0.01%) を用いた。5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 37°C にて 3 日間培養し、培養終了の 24 時間前または 3 時間前に 2D7DB を終濃度  $2 \mu\text{g/mL}$  になるように添加した。培養終了後に Annexin V、PI で二重染色し(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I、Pharming  
15   en) フローサイトメーター(EPICS XL、Coulter)にて解析した。なお陽性対照としてマイトゲン非存在下にて、ARH77 を  $2.5 \times 10^5$  cells /1 mL /ウェルずつ 24 時間培養し、PBMC と同様にして 2D7DB と反応させた。

PBMC の場合、Annexin V・PI 共陽性である死細胞の割合はマイトゲン非存在下では、29%、23%、25% (順に 2D7DB 非添加、3 時間添加、24 時間添加、以下同)、  
20   PHA-M 存在下では、20%、45%、42%、ConA 存在下では、22%、30%、34%、SAC 存在下では、31%、38%、40% であった (図 2 6 A ~ 図 2 6 D)。ARH77 の場合、16%、56%、58% であった (図 2 6 E)。以上から 2D7DB は無刺激の PBMC にはほとんど影響を与えず、マイトゲンにて活性化した PBMC に短時間で細胞死を誘導することが明らかとなった。

25

産業上の利用の可能性

- 4 5 -

- 本発明によって、高比活性の低分子化抗体を提供できるものと期待される。該低分子化抗体を使用することで、短い半減期でも十分な薬効が期待でき、さらに、薬効と毒性の乖離が可能になるものと期待できる。また、臨床投与量の低減化および生産コストの低減化など、コスト全体の低減化が図れるので抗体医薬品の開発上問題になる経済面問題の改善もまた期待される。
- 5

- 46 -

## 請求の範囲

1. ヒト白血球抗原 (HLA) を認識する低分子化抗体。
2. HLA が HLA class I である、請求項 1 に記載の低分子化抗体。
- 5 3. HLA class I が HLA-A である、請求項 2 に記載の低分子化抗体。
4. 2D7 抗体の低分子化抗体。
5. 低分子化抗体が Diabody である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の低分子化抗体。
6. 以下の (a) ～ (d) のいずれかに記載の低分子化抗体。
- 10 (a) 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
- (b) 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(a) に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 15 (c) 配列番号：2 の CDR および配列番号：4 の CDR のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
- (d) 配列番号：2 の CDR および配列番号：4 の CDR のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(c) に記載
- 20 の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
7. HLA を認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。
8. HLA が HLA class I である、請求項 7 に記載の方法。
9. HLA class I が HLA-A である、請求項 8 に記載の方法。
- 25 10. 2D7 抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。

- 47 -

- 1 1. 低分子化が Diabody 化である、請求項 7～10 のいずれかに記載の方法。
- 1 2. 活性が細胞死誘導活性又は細胞増殖抑制活性である、請求項 7～11 の  
いづれかに記載の方法。
- 1 3. 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のい  
5 づれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有  
効成分として含有する、細胞死誘導剤。
- 1 4. B 細胞または T 細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、請求  
項 13 に記載の細胞死誘導剤。
- 1 5. B 細胞または T 細胞が、活性化 B 細胞または活性化 T 細胞である、請求  
10 項 14 に記載の細胞死誘導剤。
- 1 6. 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のい  
づれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有  
効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。
- 1 7. 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のい  
15 づれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有  
効成分として含有する、抗腫瘍剤。
- 1 8. 腫瘍が血液腫瘍である請求項 17 に記載の抗腫瘍剤。
- 1 9. 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のい  
づれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有  
20 効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。
- 2 0. 抗体が Diabody である請求項 13～15 のいずれかに記載の細胞死誘導  
剤。
- 2 1. 抗体が Diabody である請求項 16 に記載の細胞増殖抑制剤。
- 2 2. 抗体が Diabody である請求項 17 または 18 に記載の抗腫瘍剤。
- 25 2 3. 抗体が Diabody である請求項 19 に記載の自己免疫疾患治療剤。



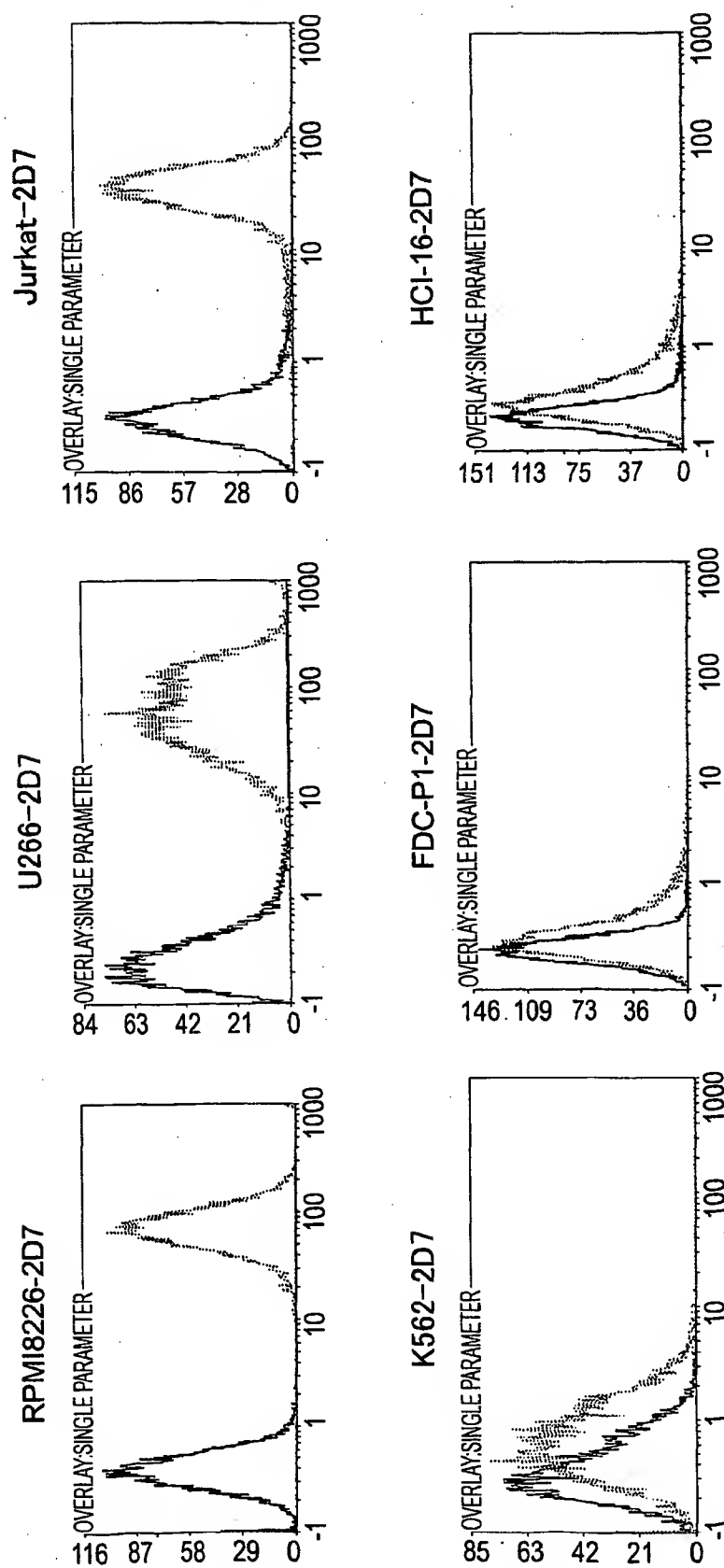
1 / 37

図 1

5'-AATTCC**CAGCACAGTGG**TAGATAAGTAAG (配列番号:7)  
GGGTCGTGT**CACC**ATCTATTCATTCAGCT-5' (配列番号:8)

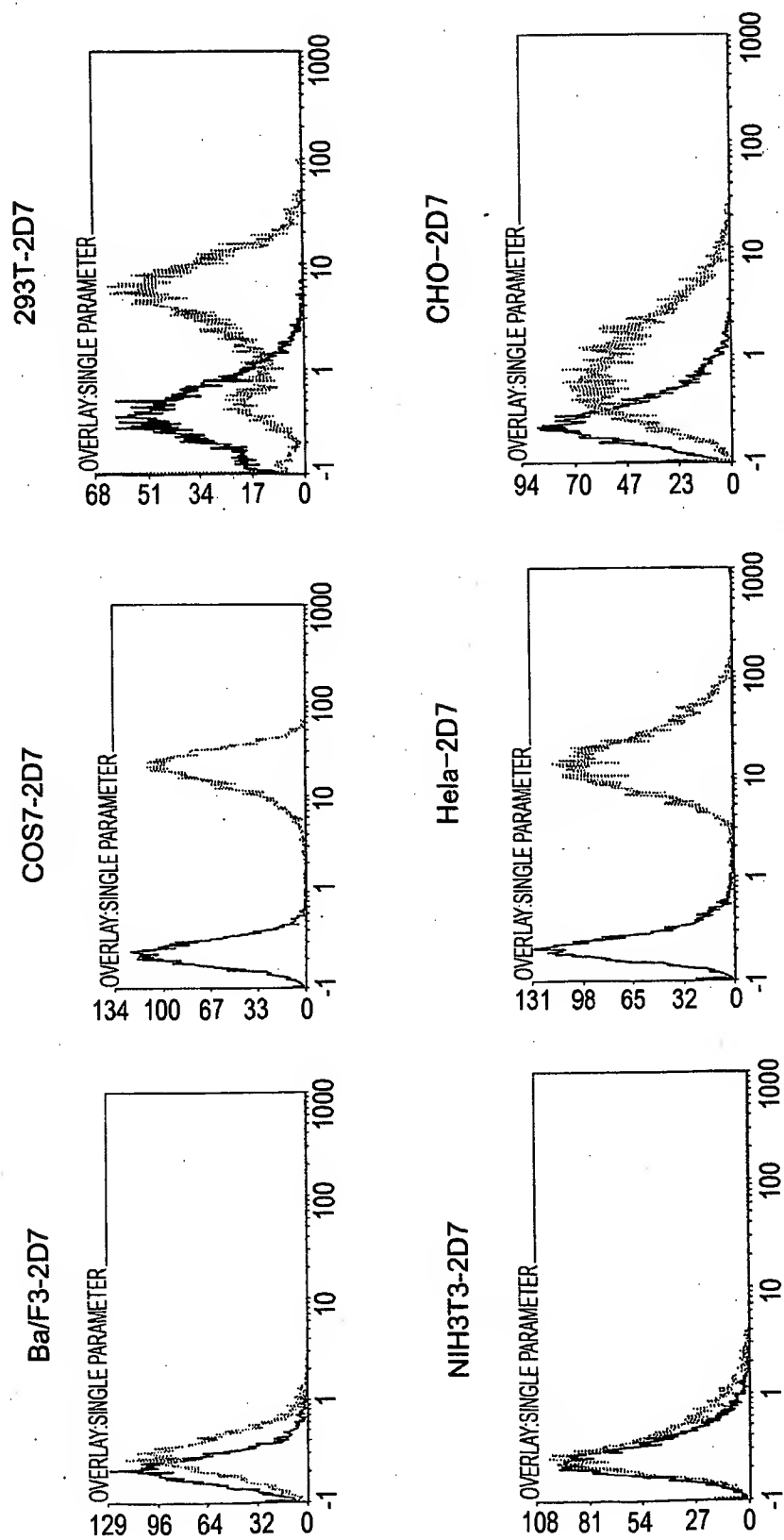
2 / 37

図 2 A



3 / 37

図 2 B



4 / 37

図 3

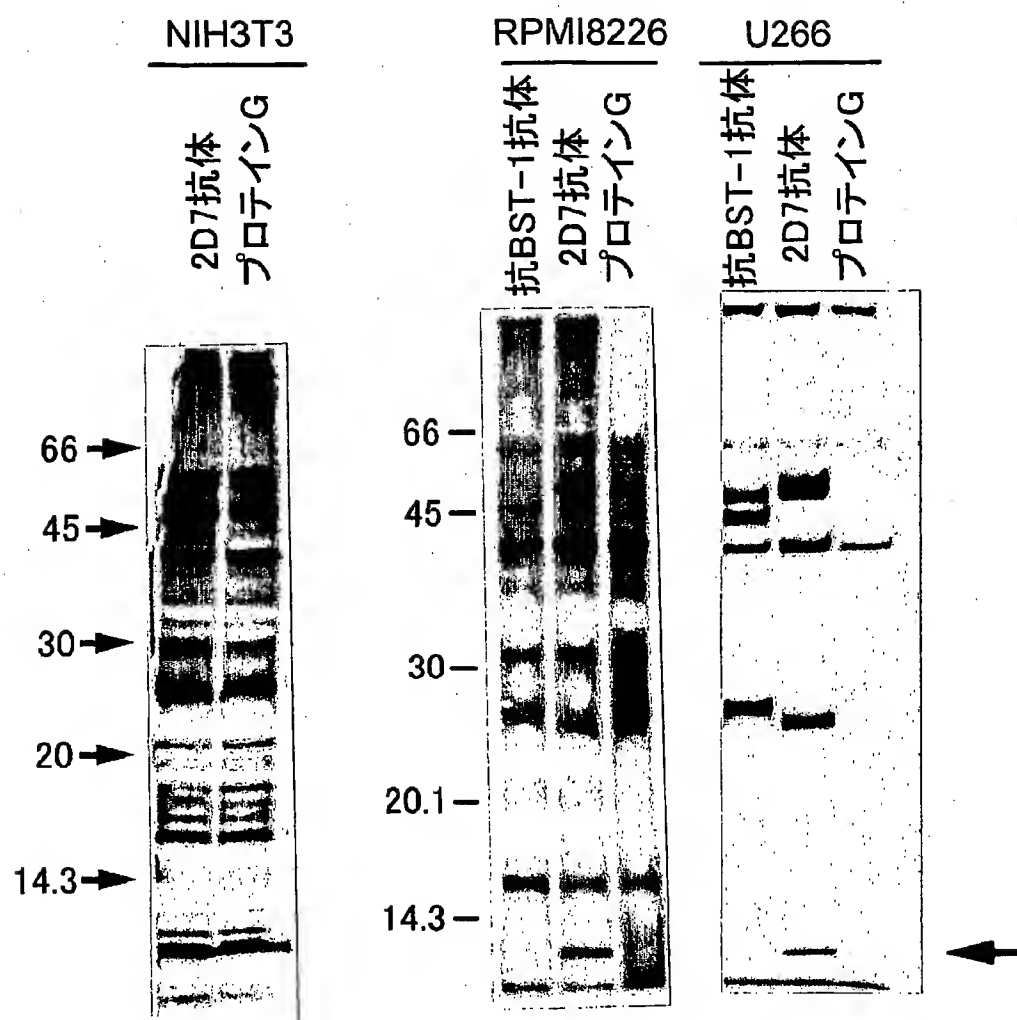


図 4 A

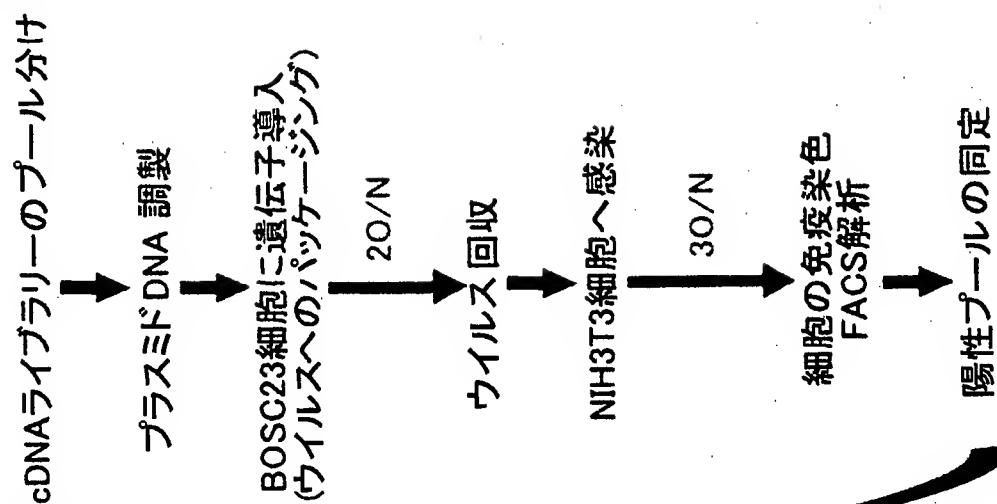
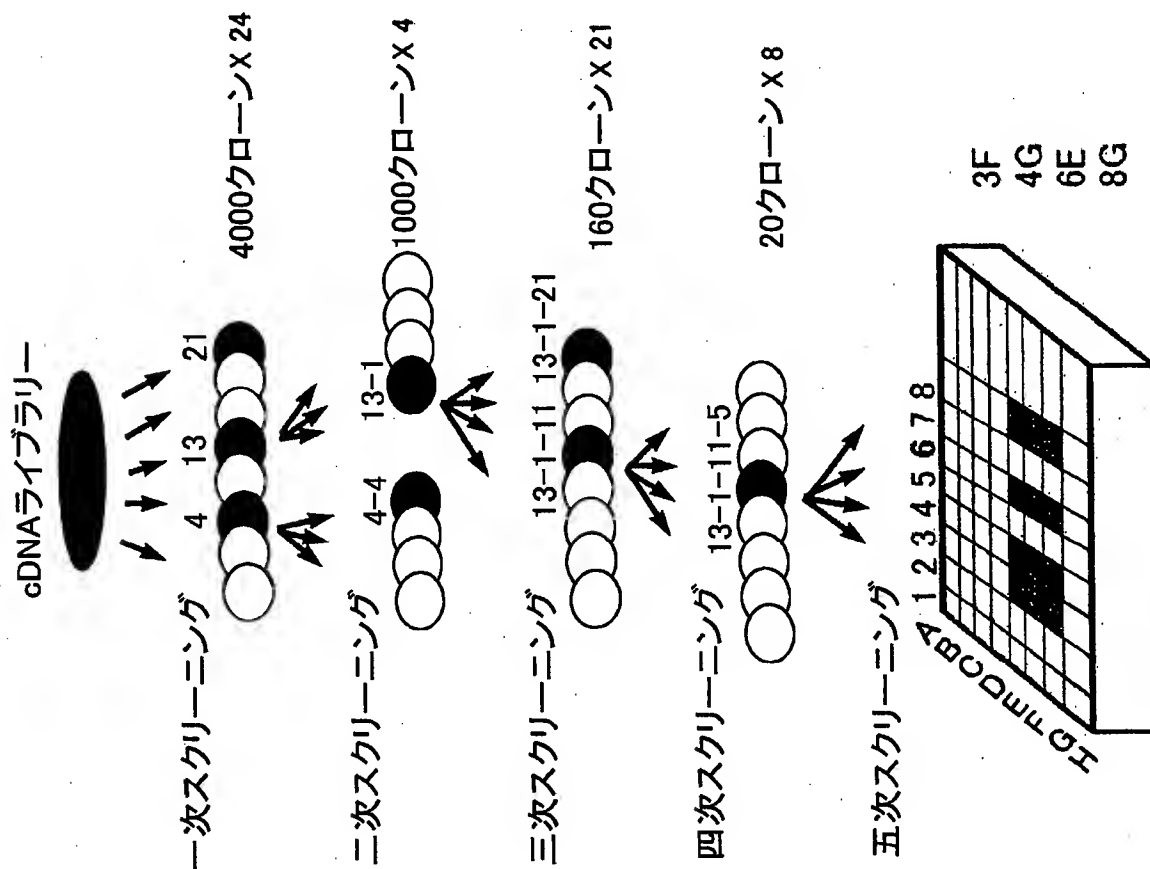
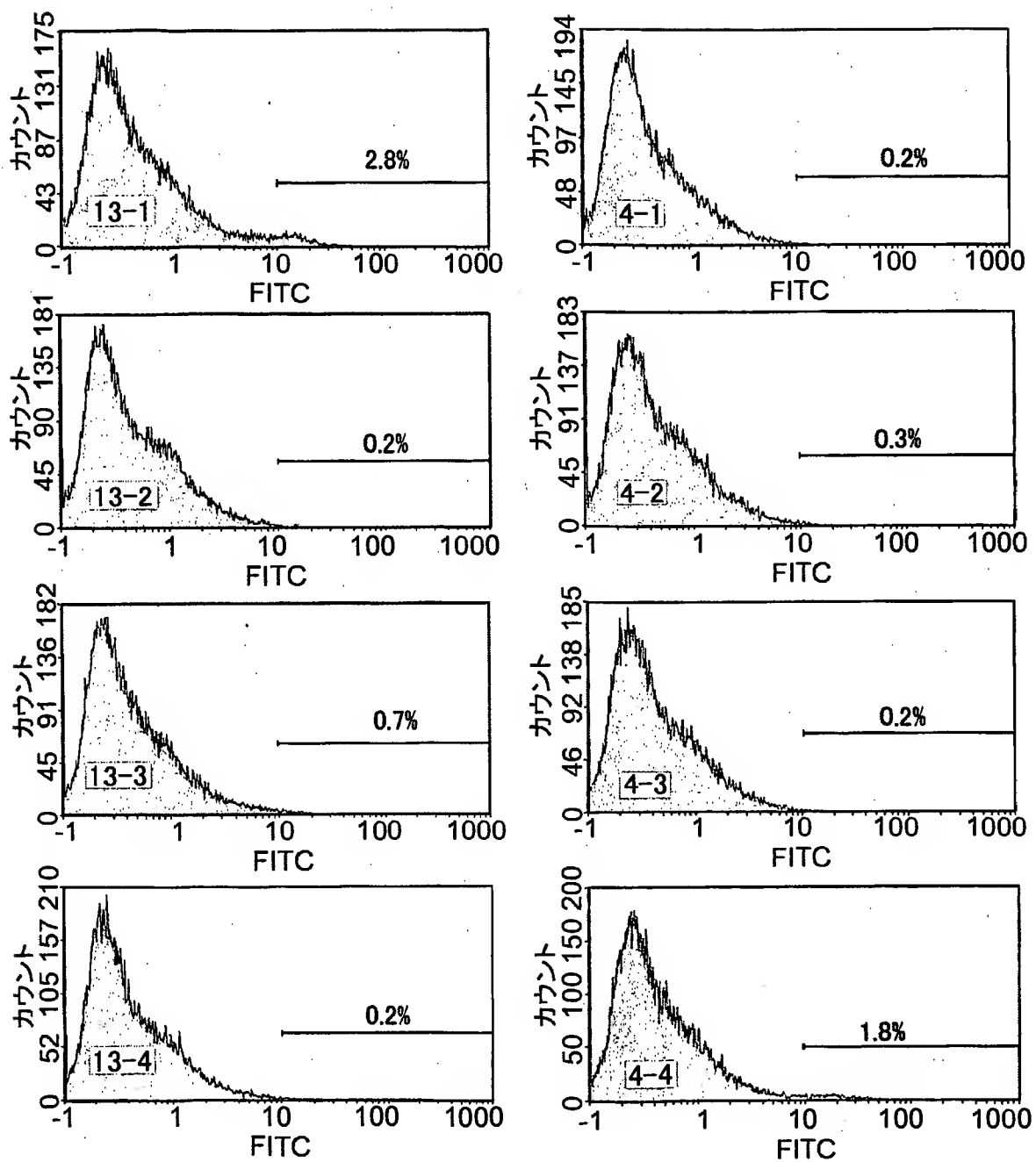


図 4 B



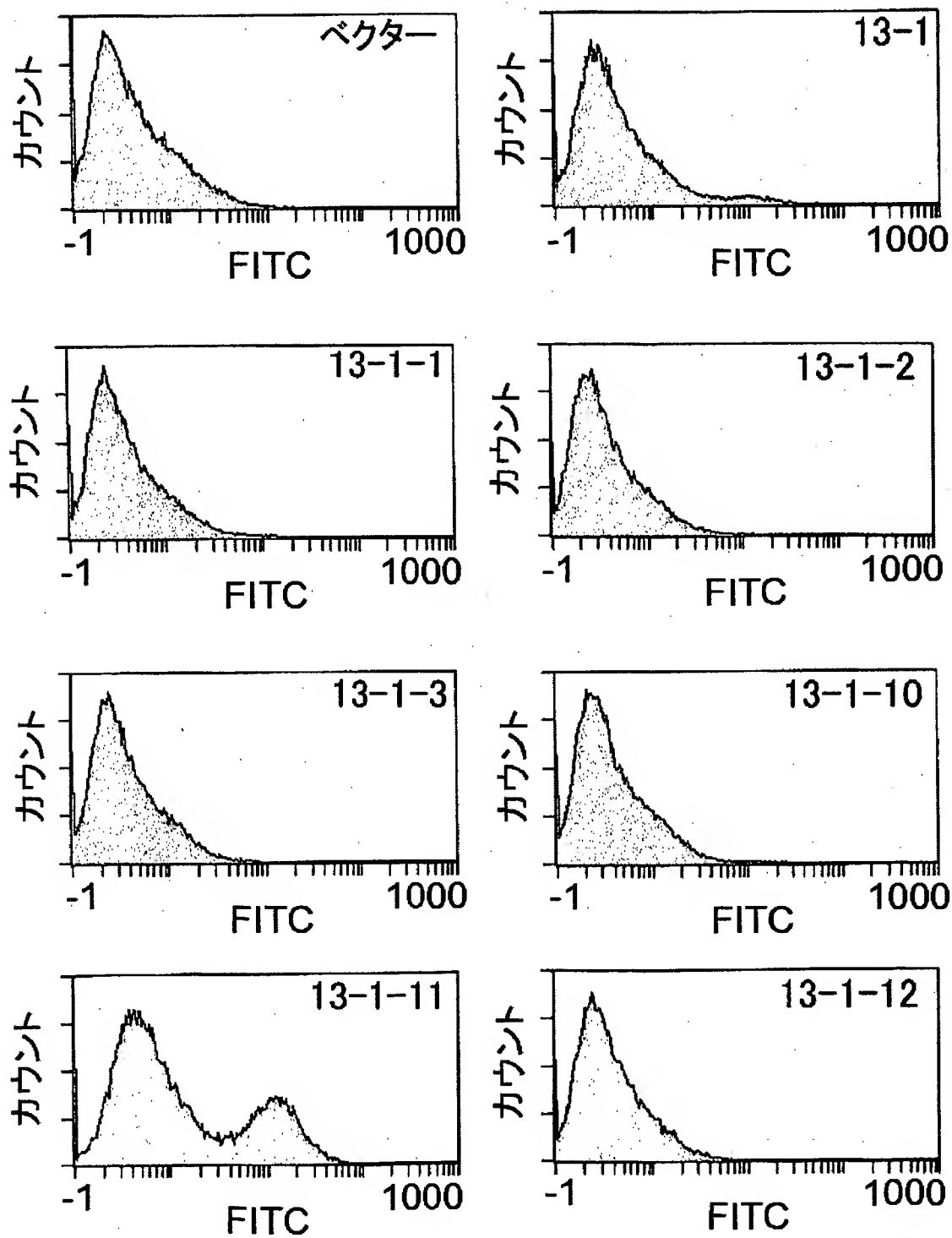
6 / 37

図 5 A



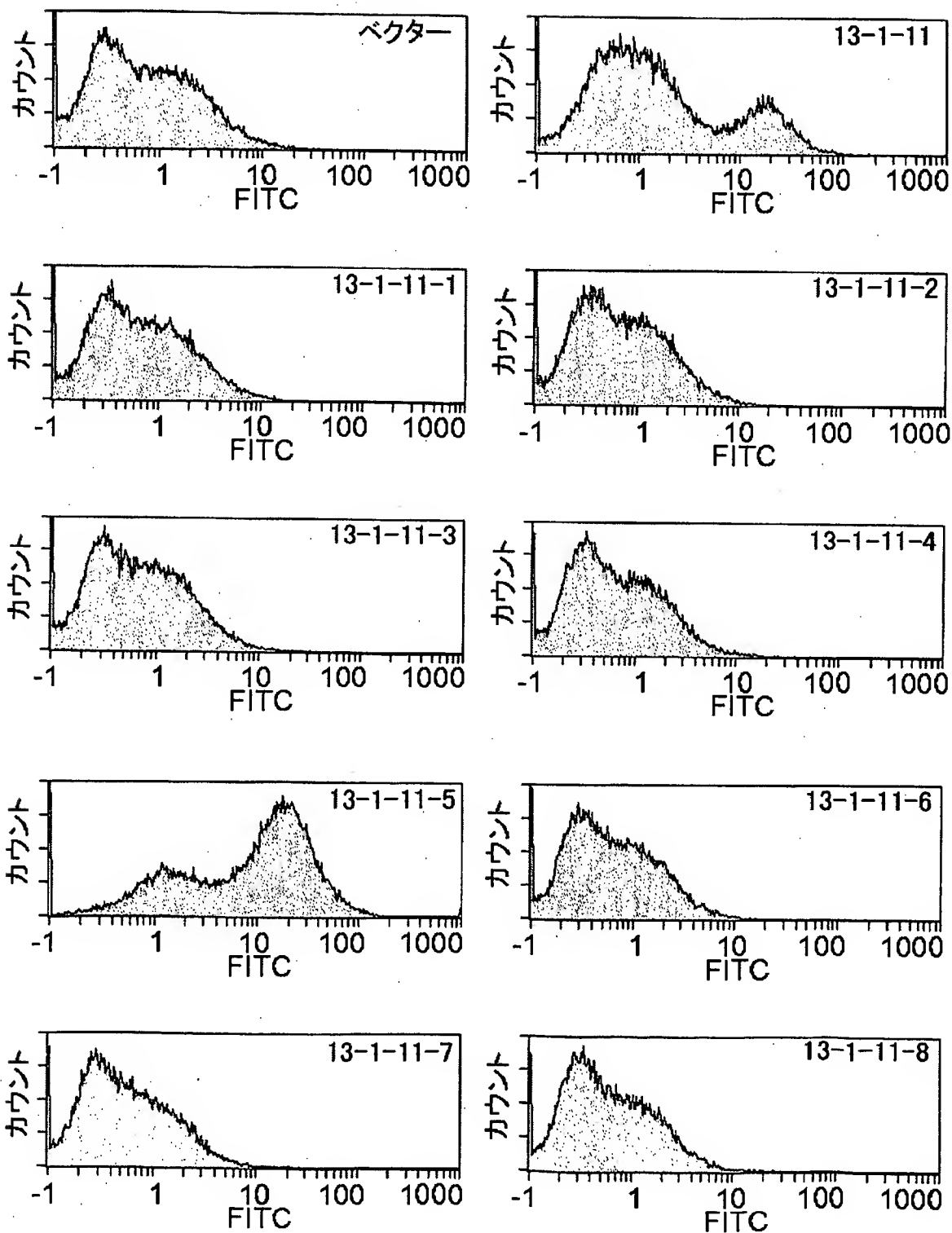
7 / 37

図 5 B



8 / 37

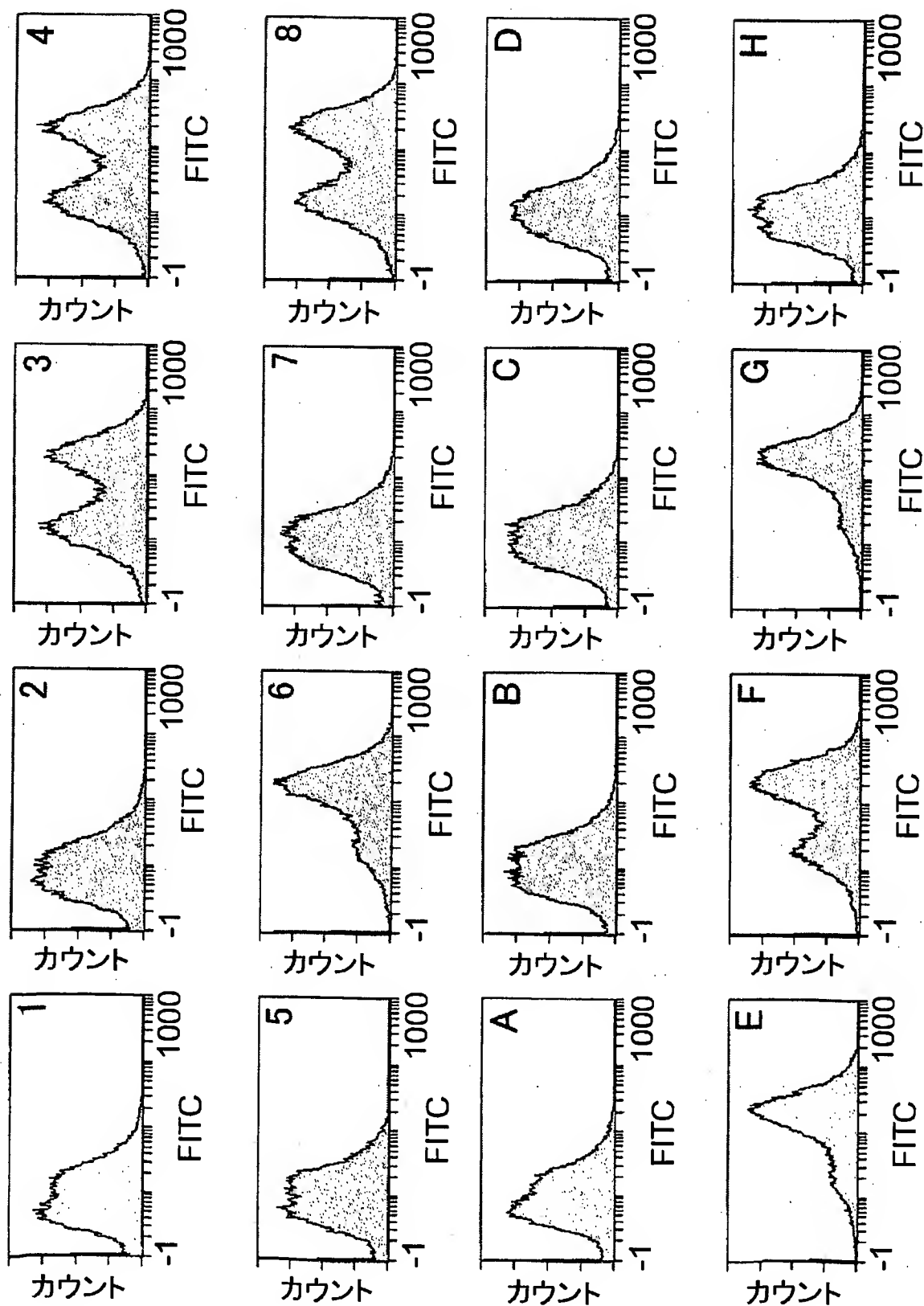
図 5 C





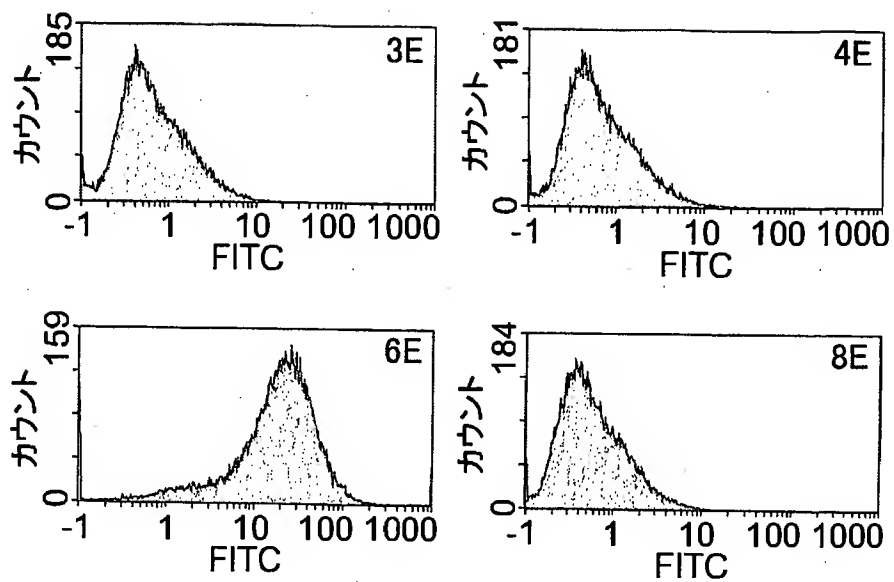
9 / 37

図 6 A



10/37

図 6 B



11/37

図 7 A

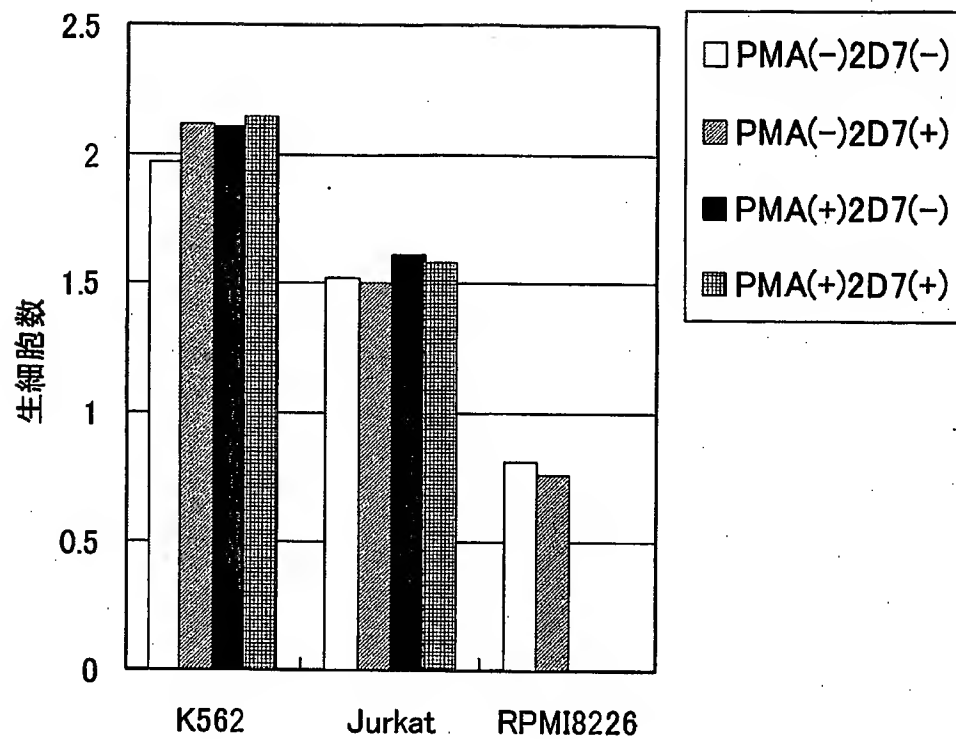


図 7 B

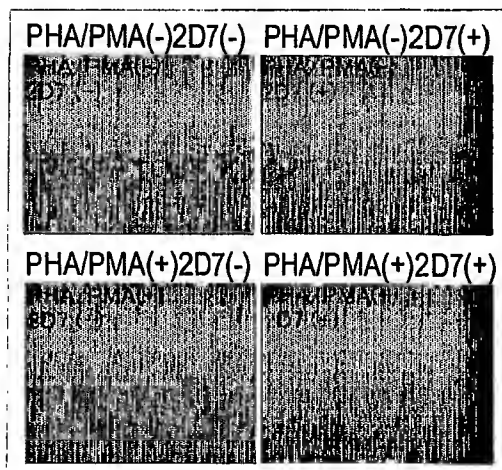


図 7 C

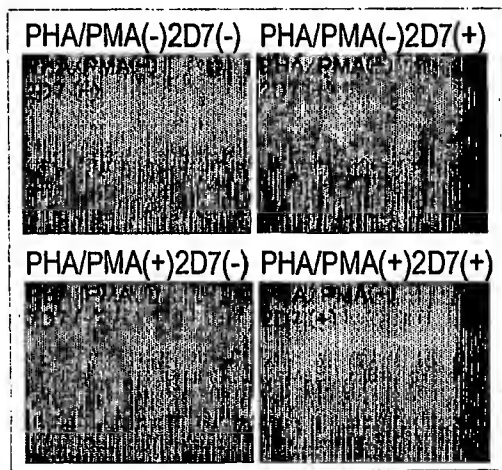
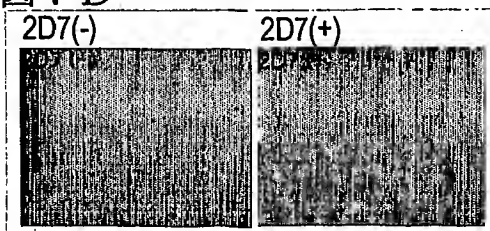
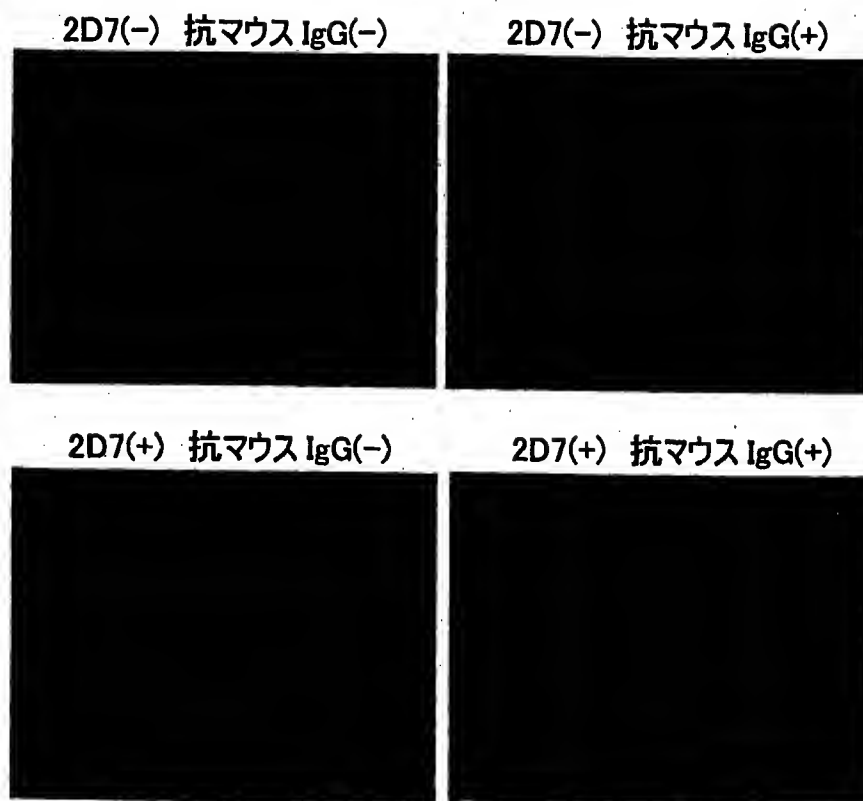


図 7 D



12 / 37

図 8



10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CCTgaattcca	CCATGCGAGTGGAGTCTTTCTCTCCTCCTGTCAATAACTGCAGGTGTCCAGTTCAGTTGCAGCAGTCTGGACCTGAG								
	M R W S W I F L F L L S I T A G V H C Q V Q L Q O S G P E								
heavy chainのリーダ配列									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTTGAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAGACTACTTTATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGG									
L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T D Y F I H W V K Q R P G Q G									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GACTTGAATGGATTGGATGGATTTTTCCTGGAGATGATACTACTGATTACAATGAGAAGTTCAGGGGCAAGACCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAG									
L E W I G W I F P G D D T T D Y N E K F R G K T T L T A D K S S									
heavy chainの可変領域									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CACAGCCTACATTTTGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATGTATTTCTGTGAAGGAGTGACGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACT									
T A Y I L L S S L T S E D S A M Y F C V R S D D F D Y W G Q G T T									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
CTCACAGTCTCCTCAGgtggagcggtagccAAATGTCTCACCCAGTCGCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACATAACCTGCA									
L T V S S G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I T C S									
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCAGTGGTTCAGCAGAGAAGCCAGGCACCTTTCCCAAACCTCTGGATTATAGCACATCCAACTGGCTTCTGGAGT									
A S S S V S Y M H W F Q Q K P G T F P K L W I Y S T S N L A S G V									
light chainの可変領域									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
CCCTACTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCAACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAGG									
P T R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R									
710	720	730	740	750	760	770	780	790	
ACGAGTTATCCACCCACGTTTCGGCTCGGGGCAAAAGTTGGAGATAAAAgactacaaggatgacgacgataagtgataagcgccgcaat									
T S Y P P T F G S G T K L E I K D Y K D D D K									
flag-tag									

14/37

図10A

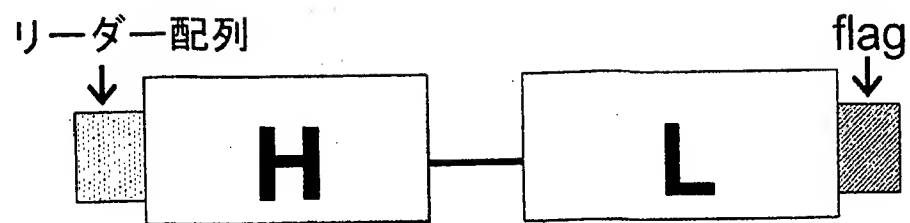


図10B

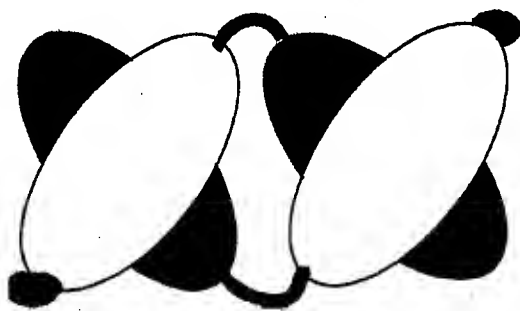
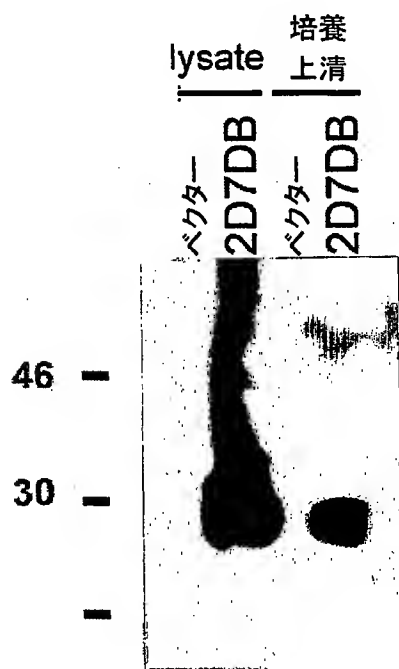
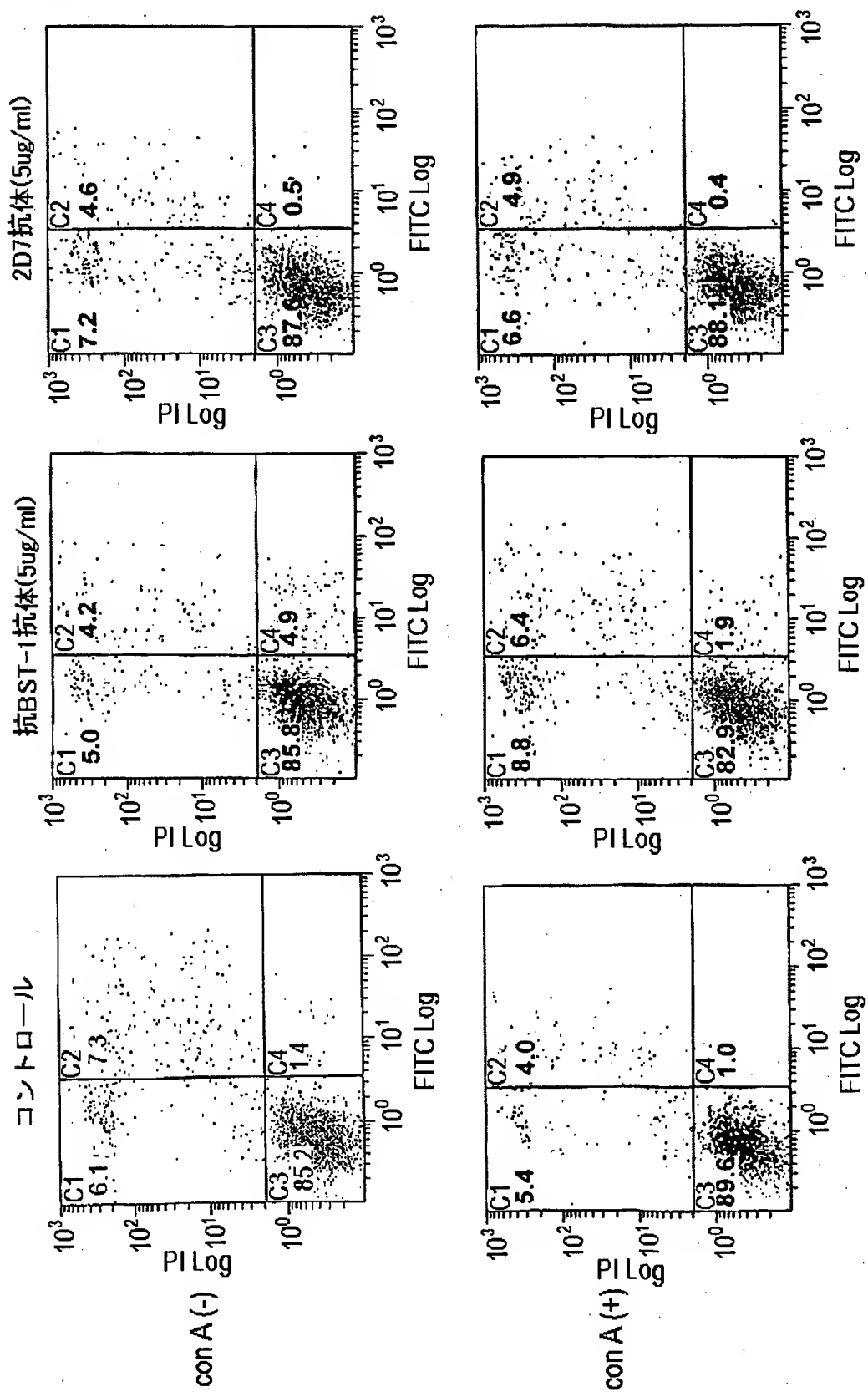


図10C



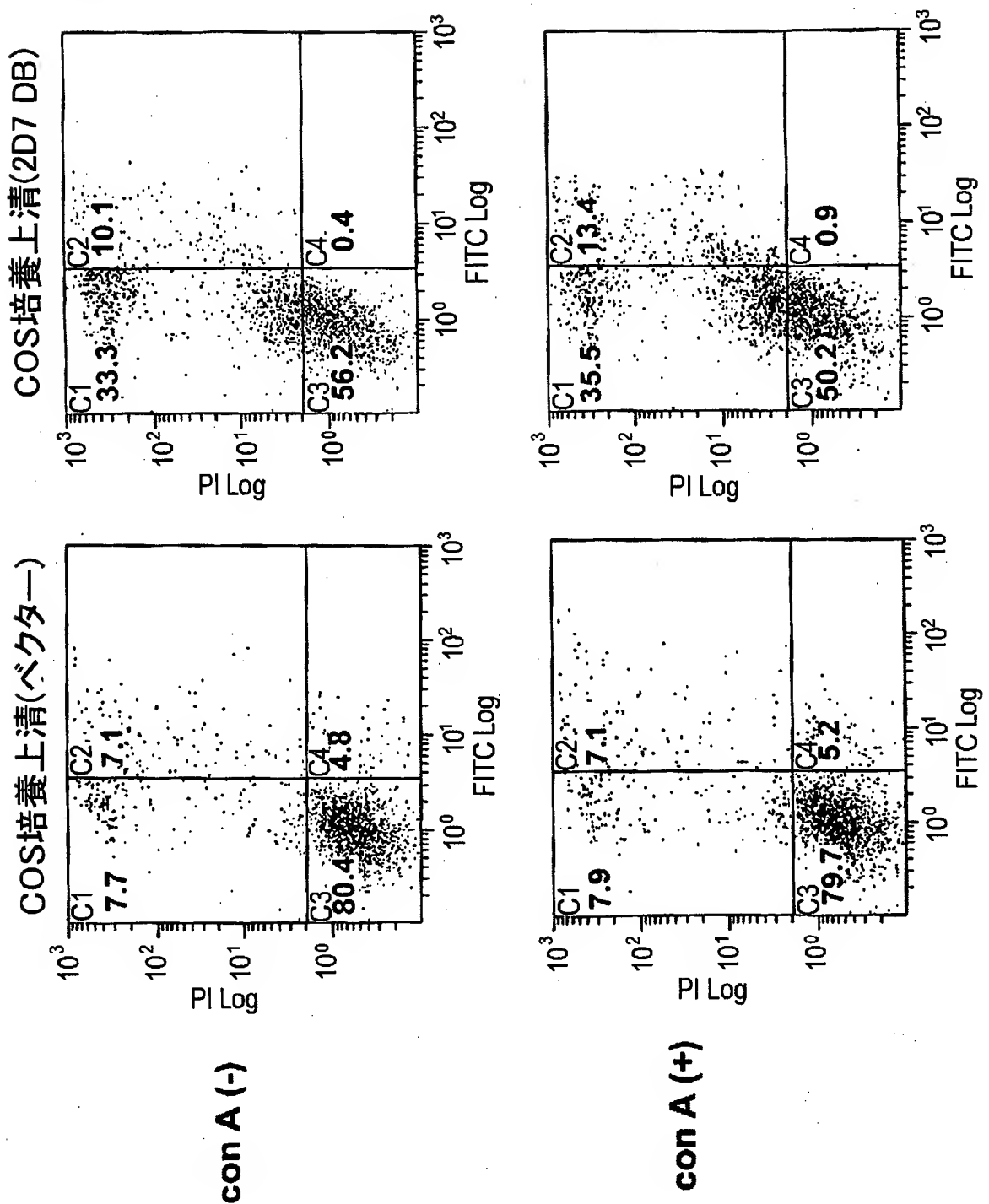
15/37

図 11A



16 / 37

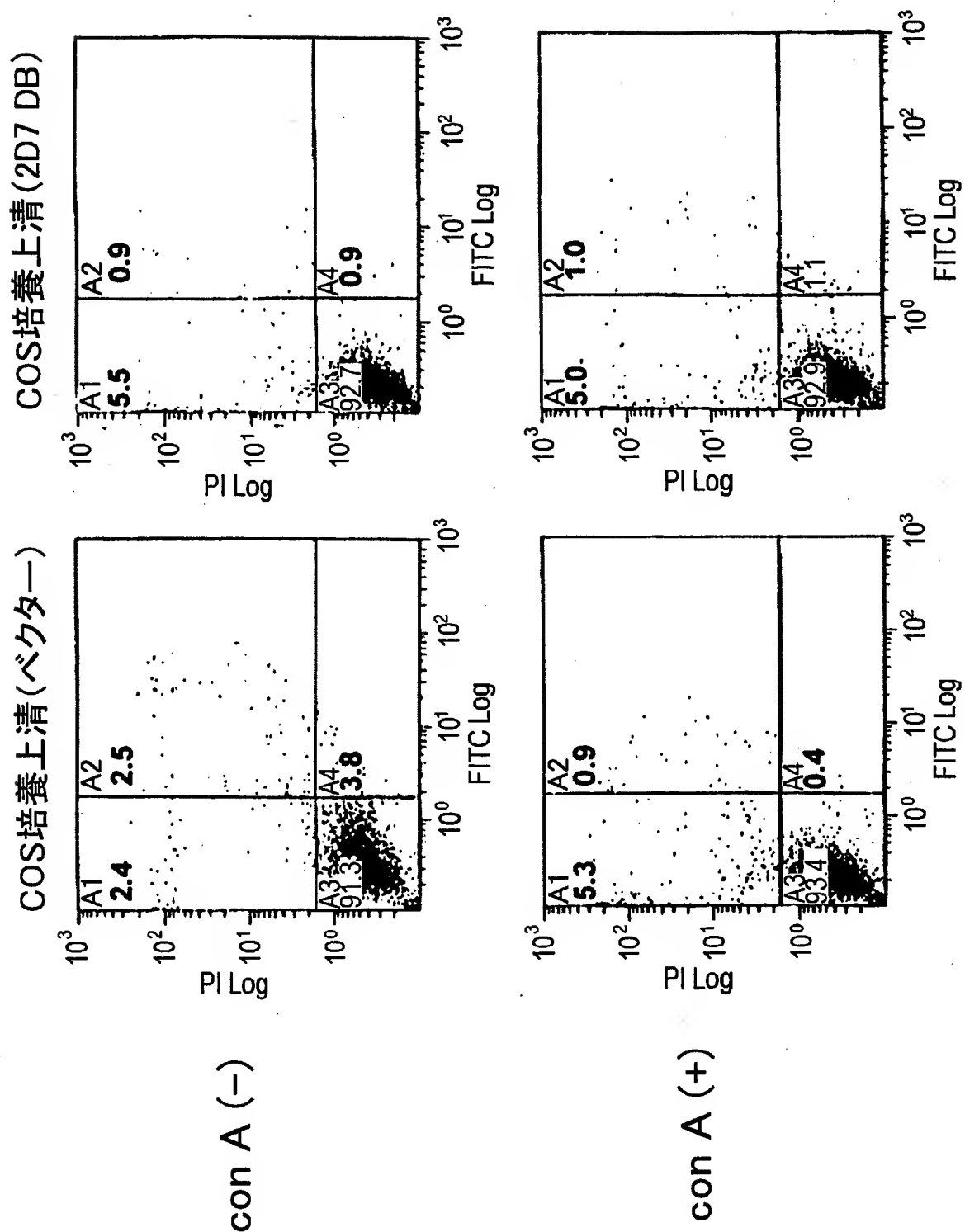
図 11 B





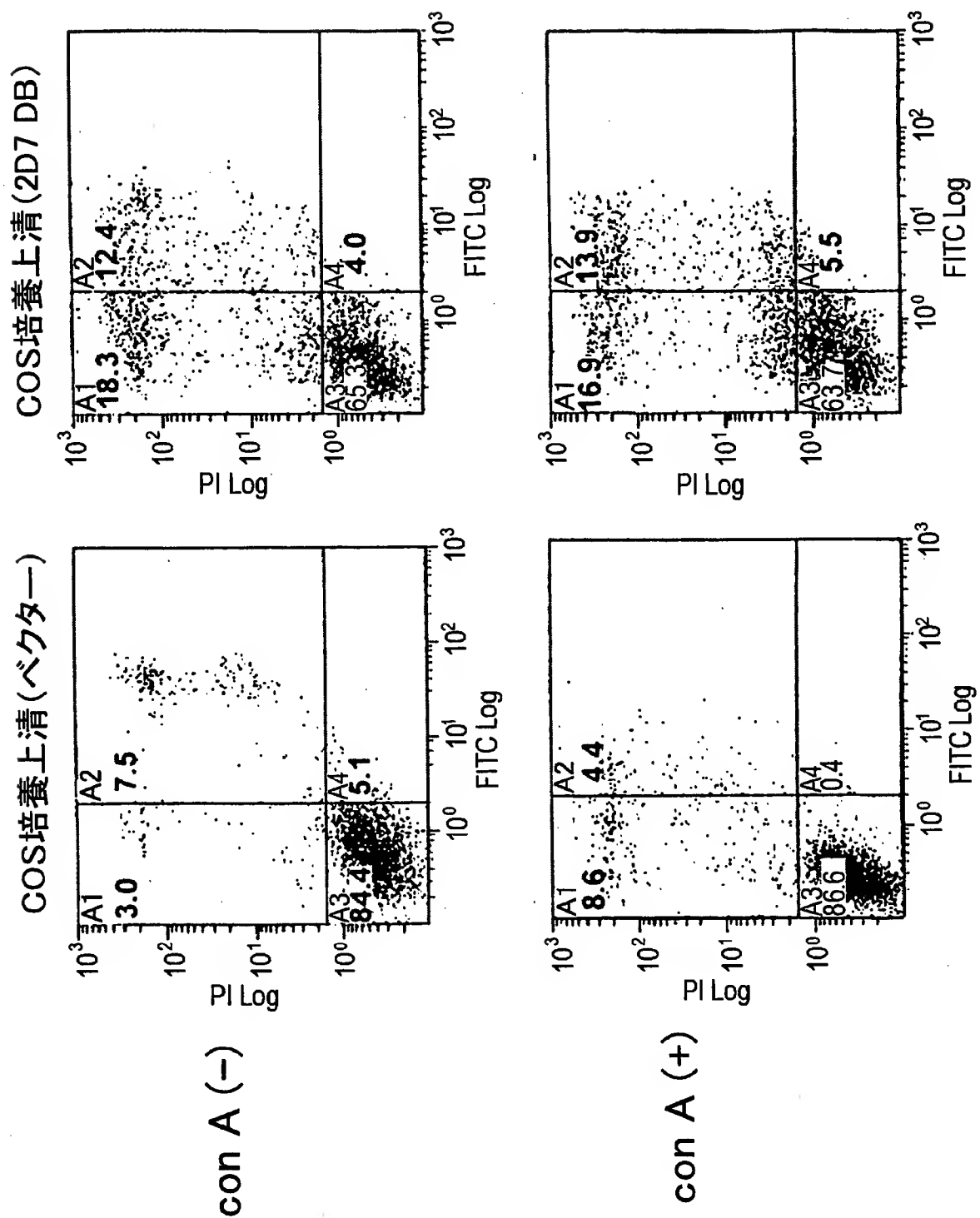
17 / 37

図 1 2 A



18/37

図 12 B



19/37

図 1 3 A

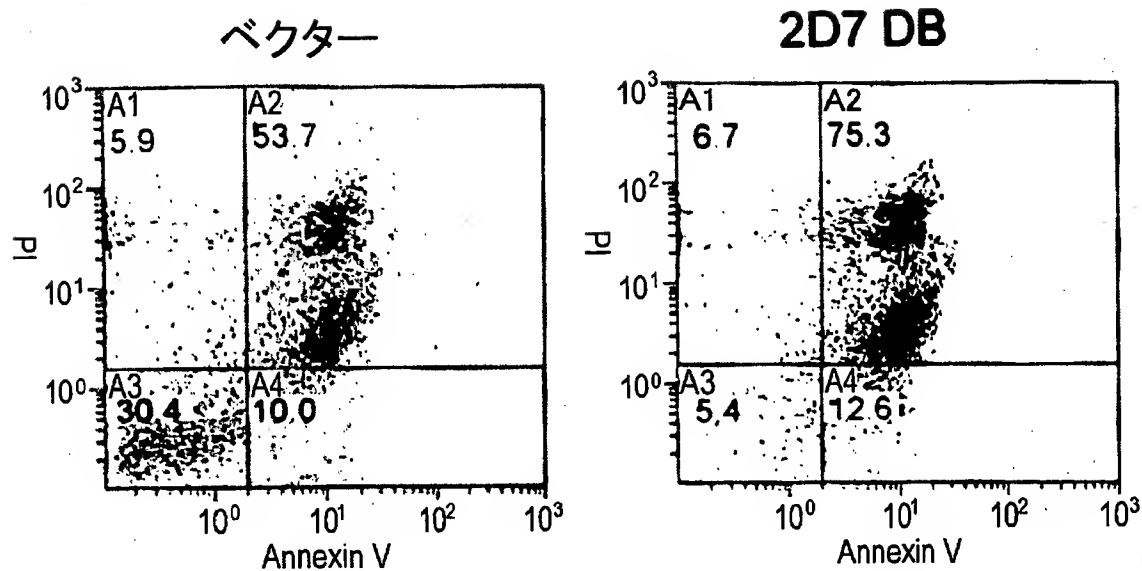
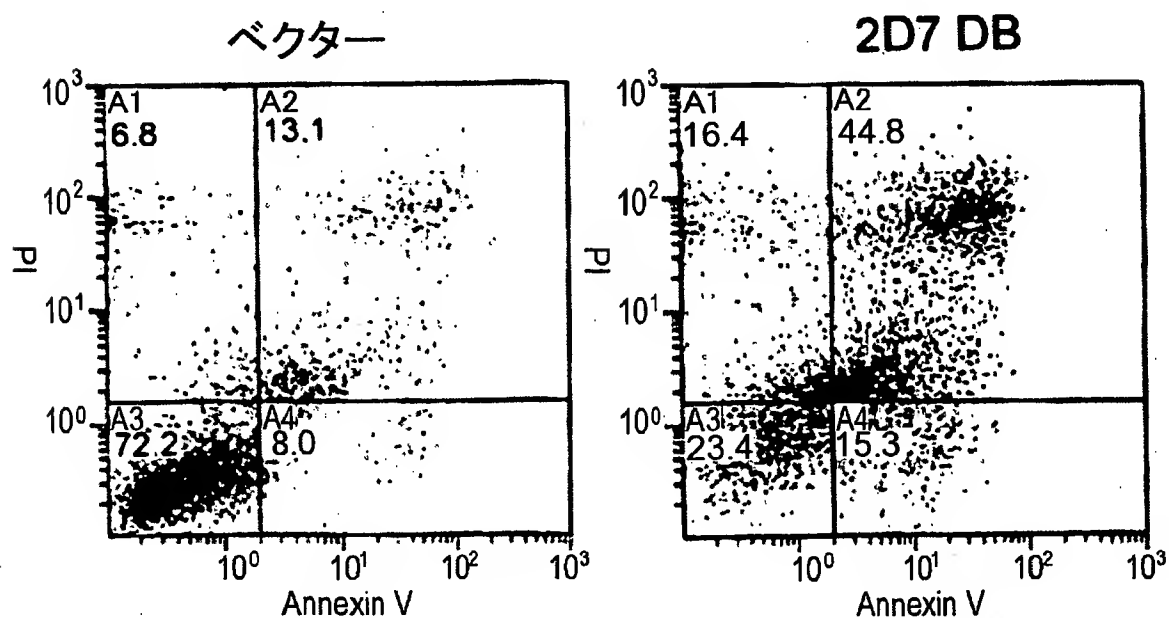


図 1 3 B



20 / 37

図 1 3 C

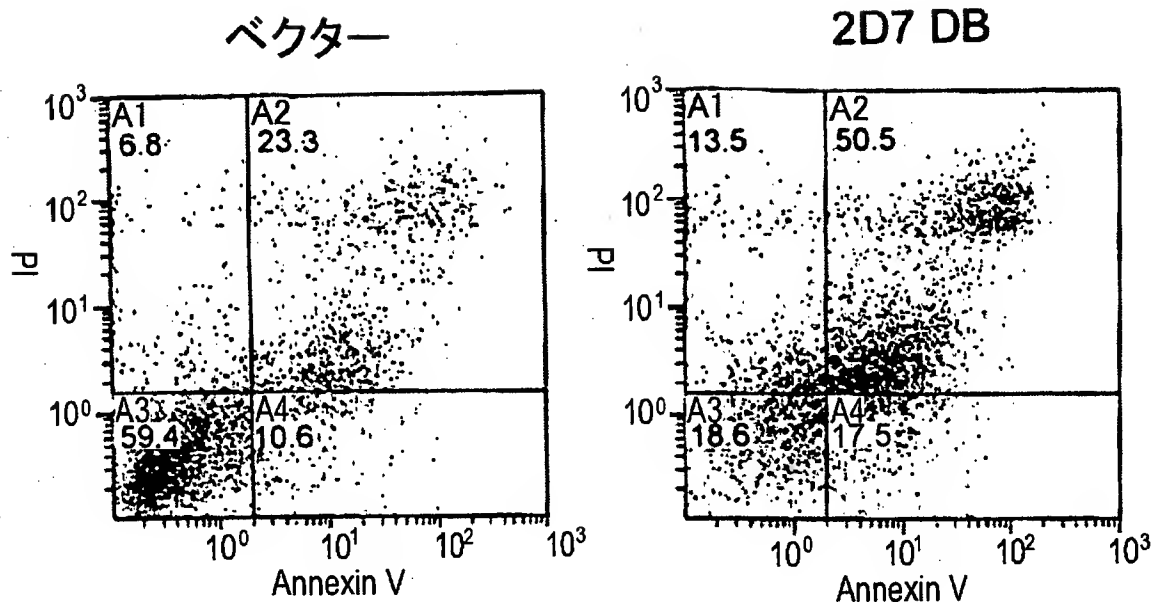
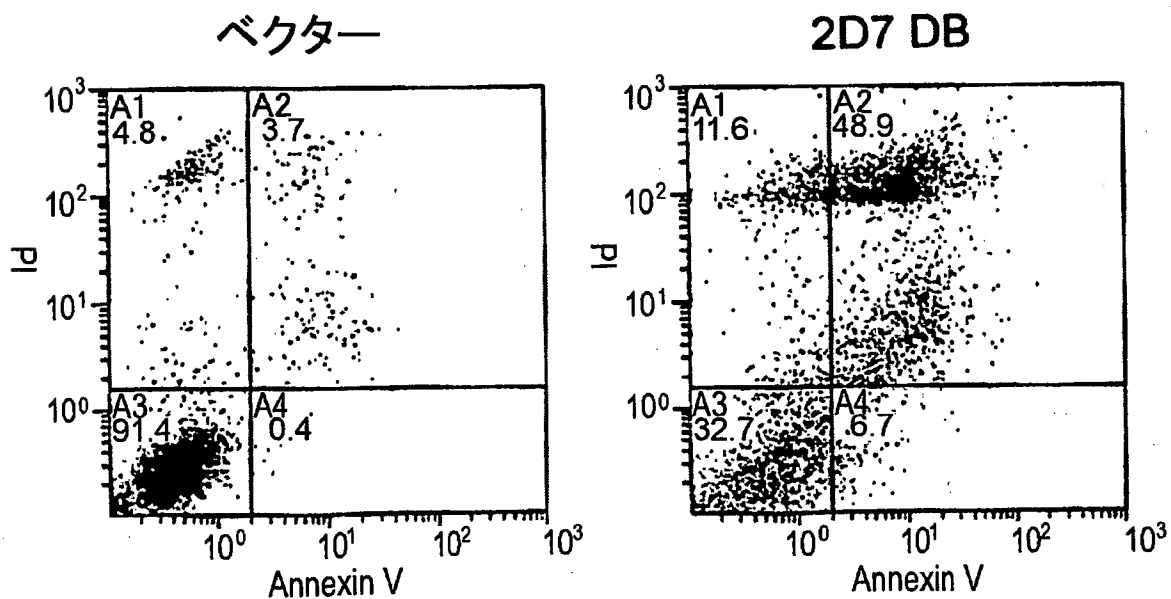
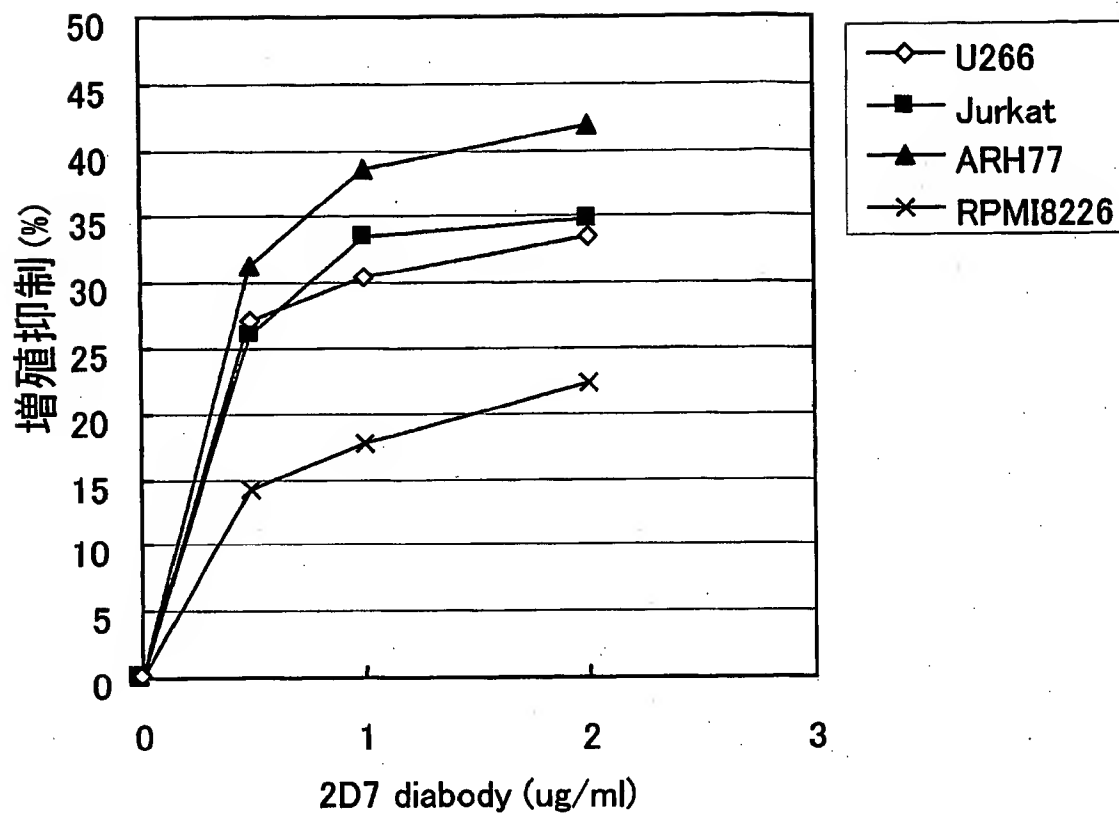


図 1 3 D



21/37

図 14



22 / 37

図 15 A

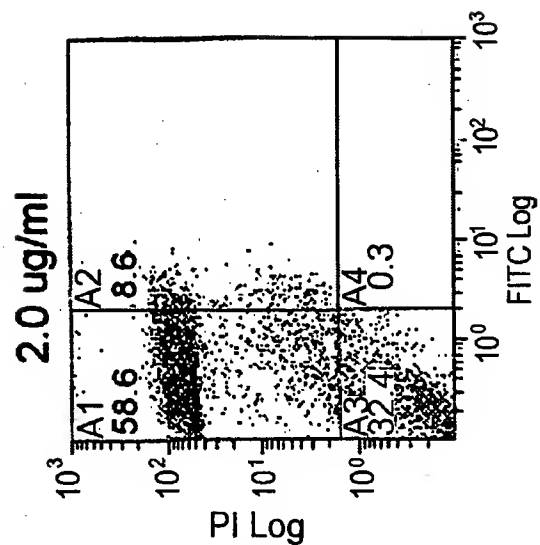
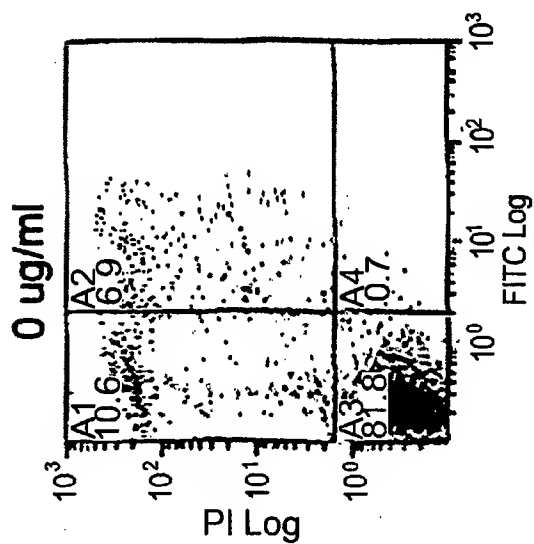
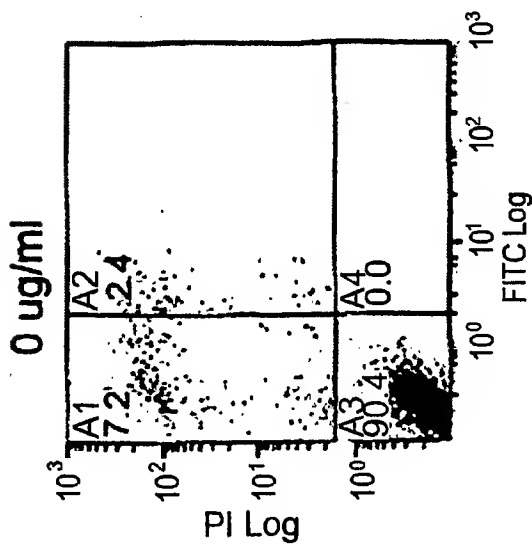
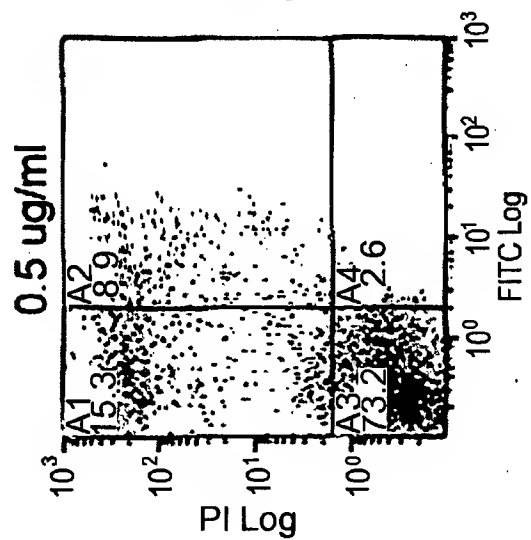
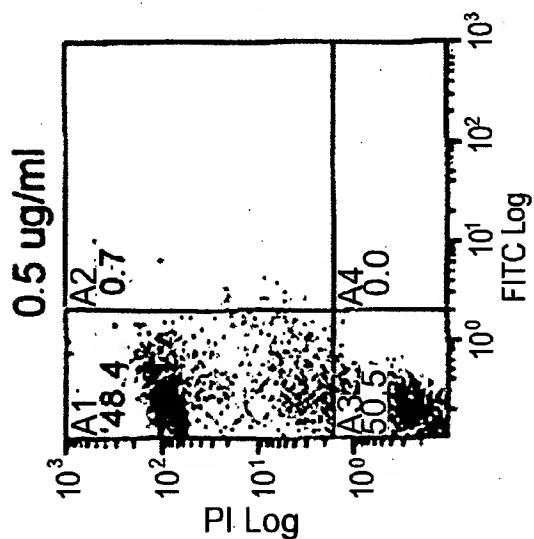
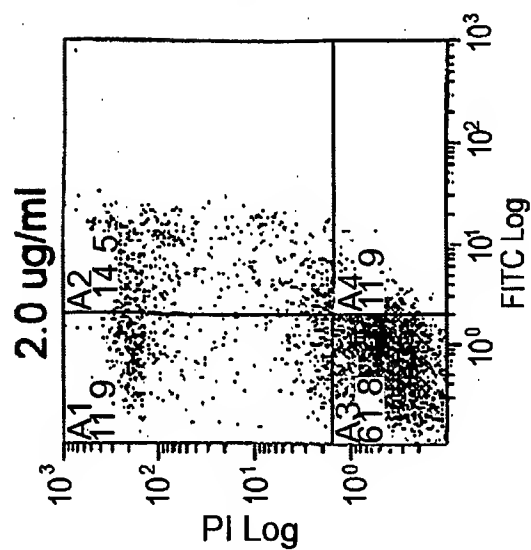
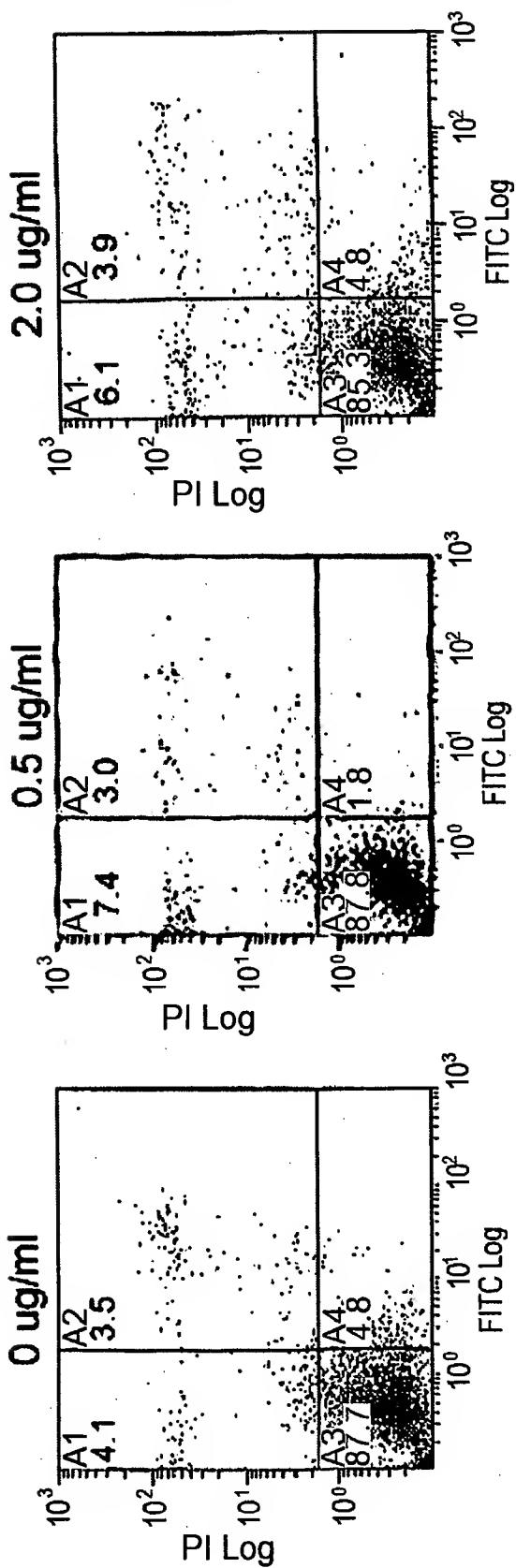


図 15 B

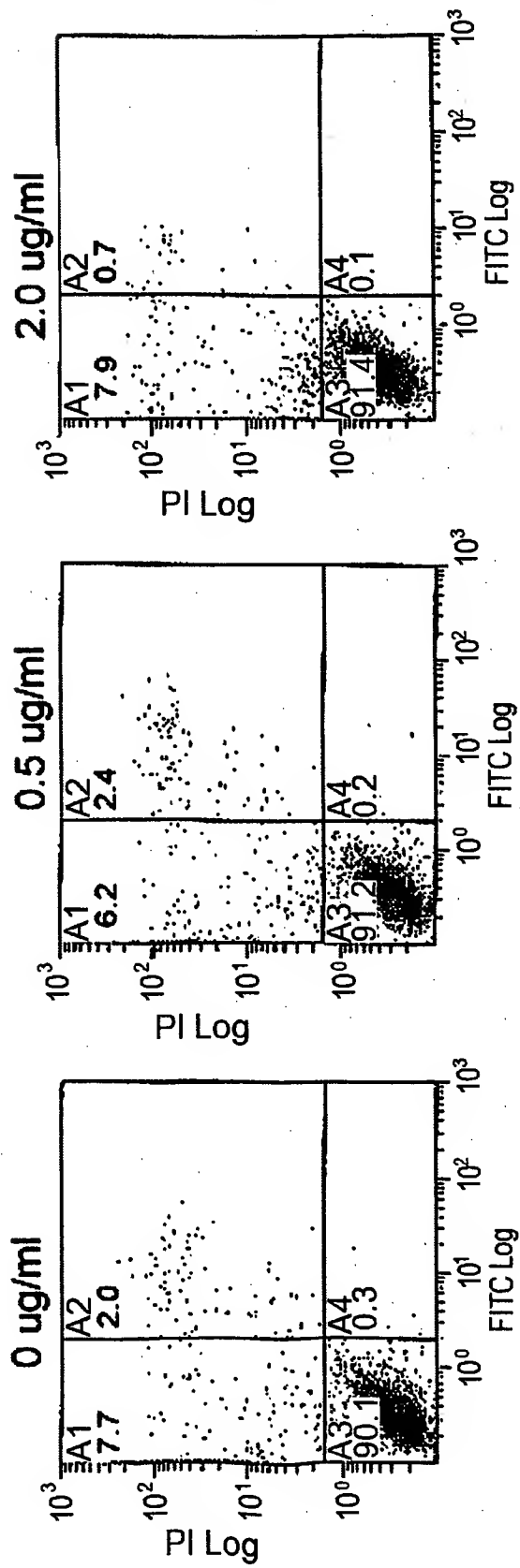


23 / 37

15 C



15 D



24 / 37

図 16 A

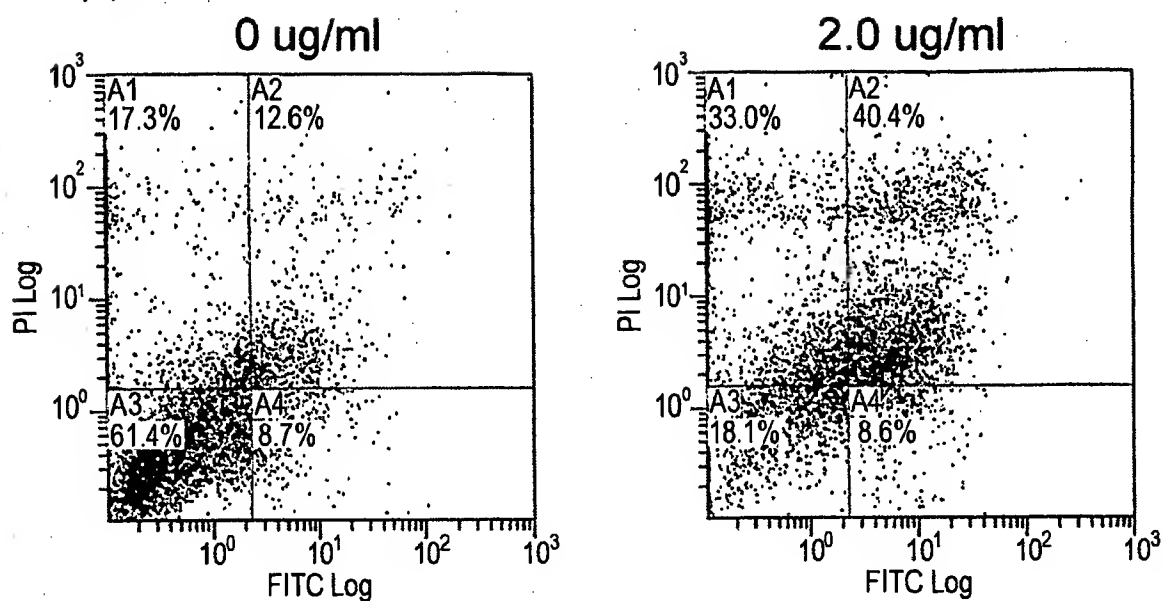
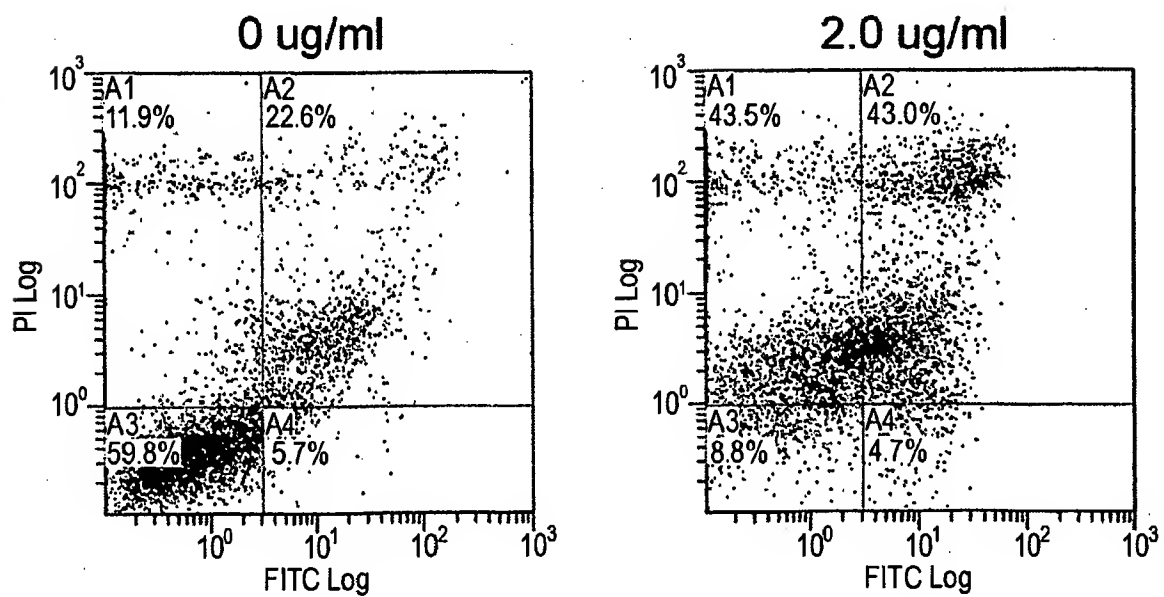


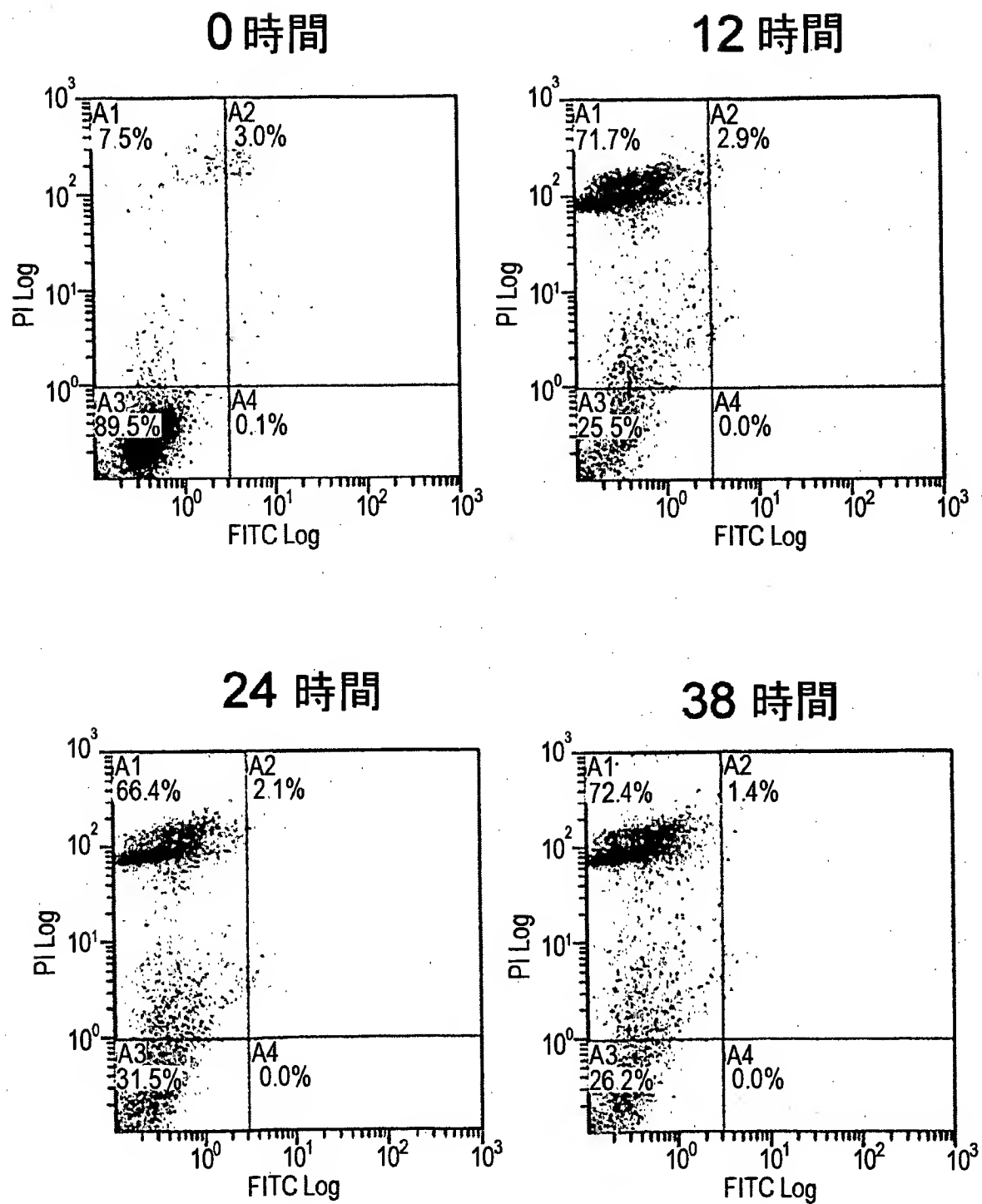
図 16 B





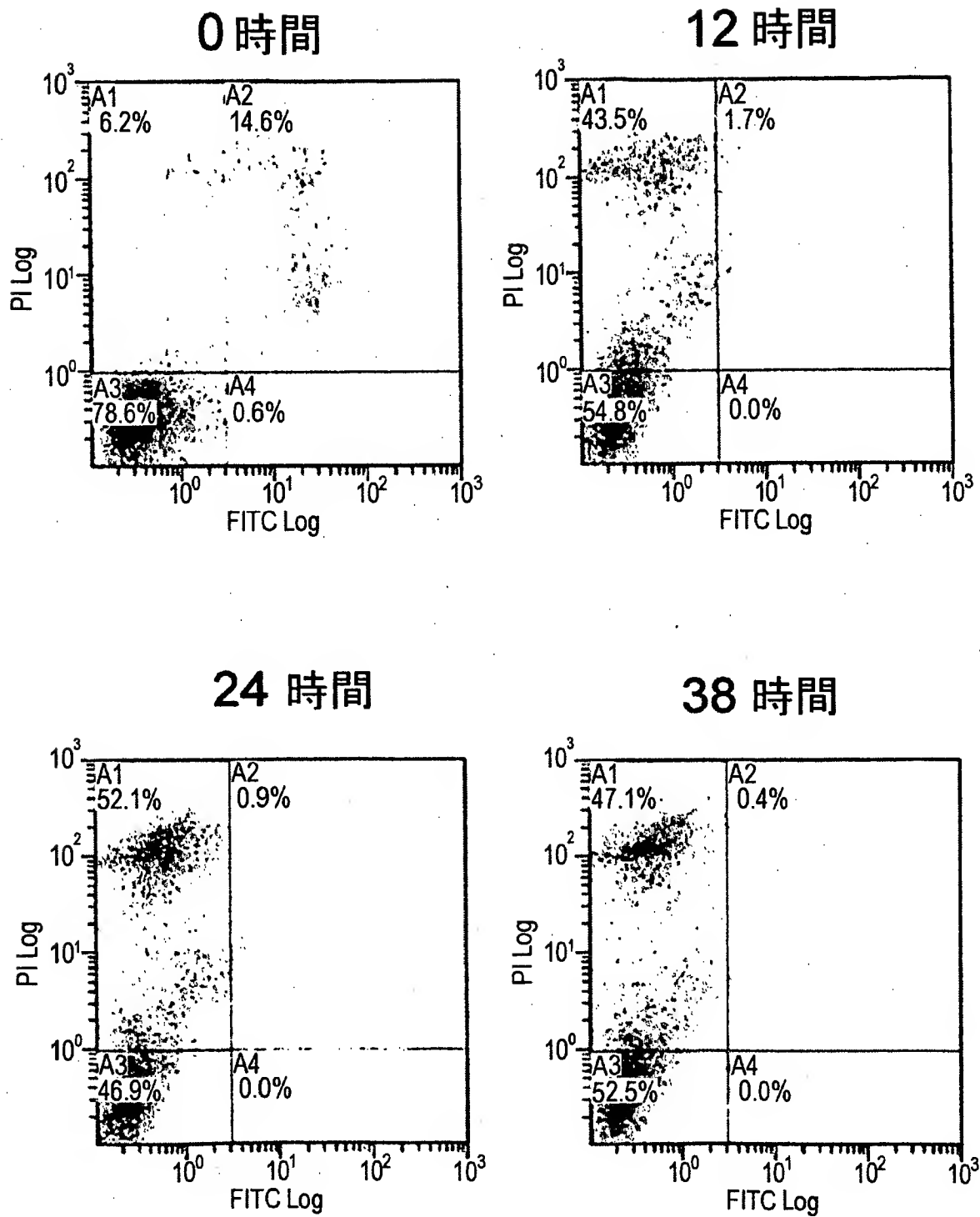
25 / 37

図 17 A



26 / 37

図 17 B



27 / 37

図 18 A

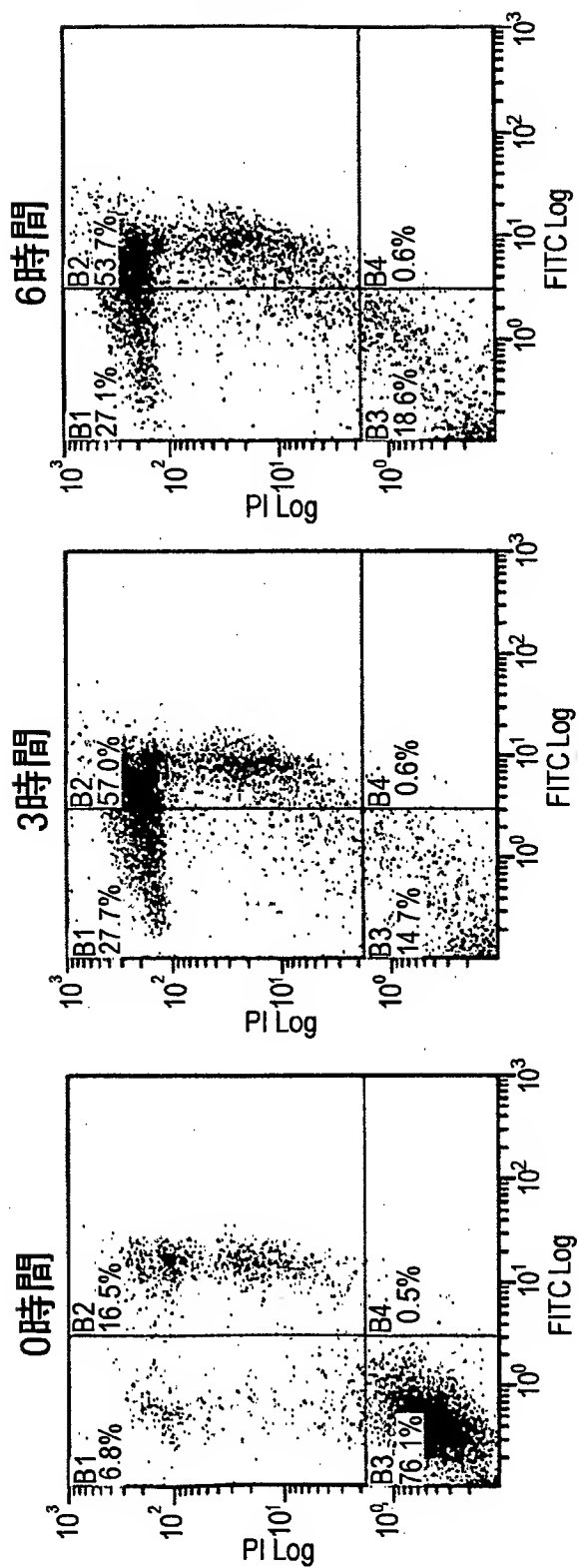
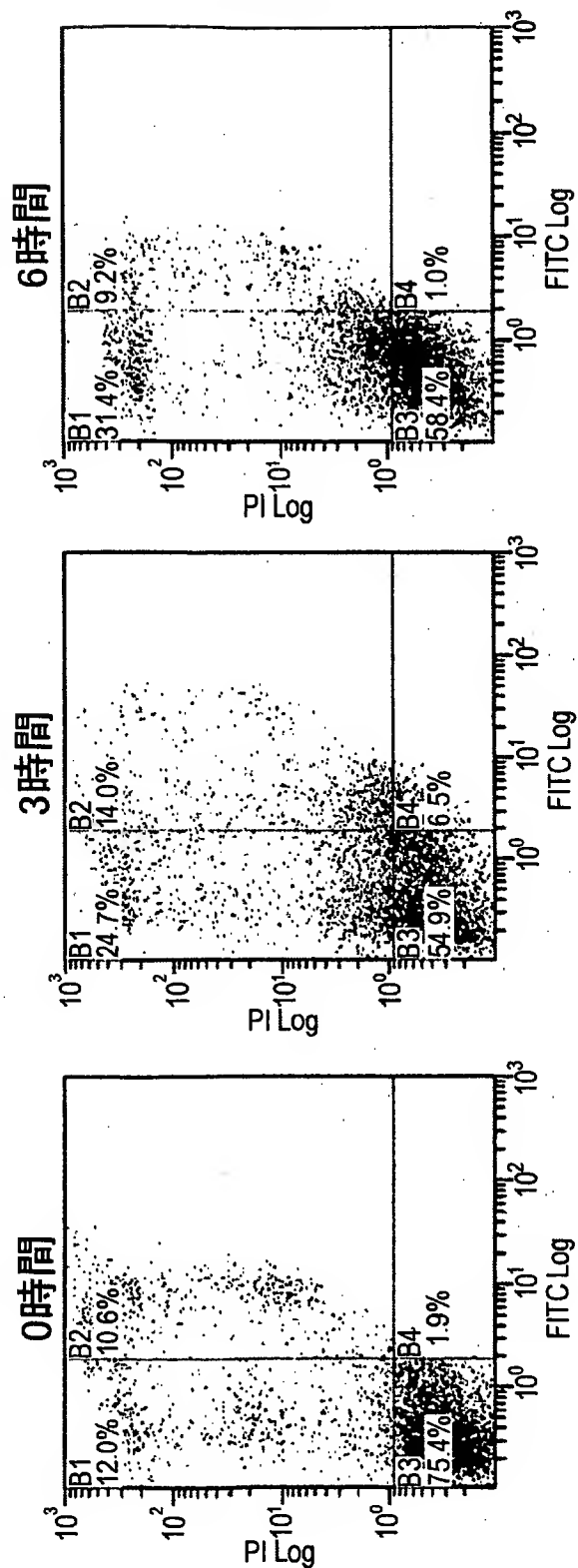
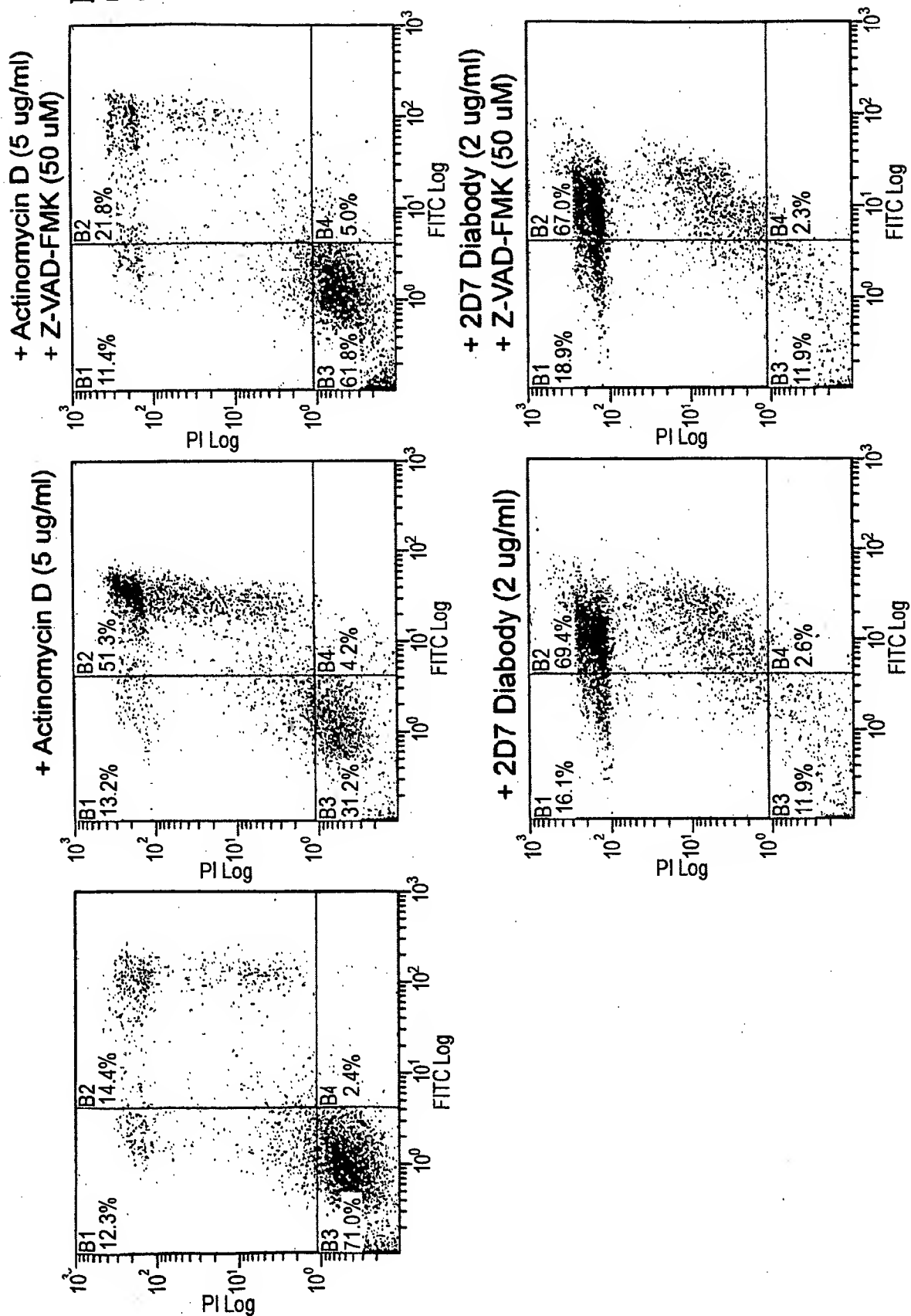


図 18 B



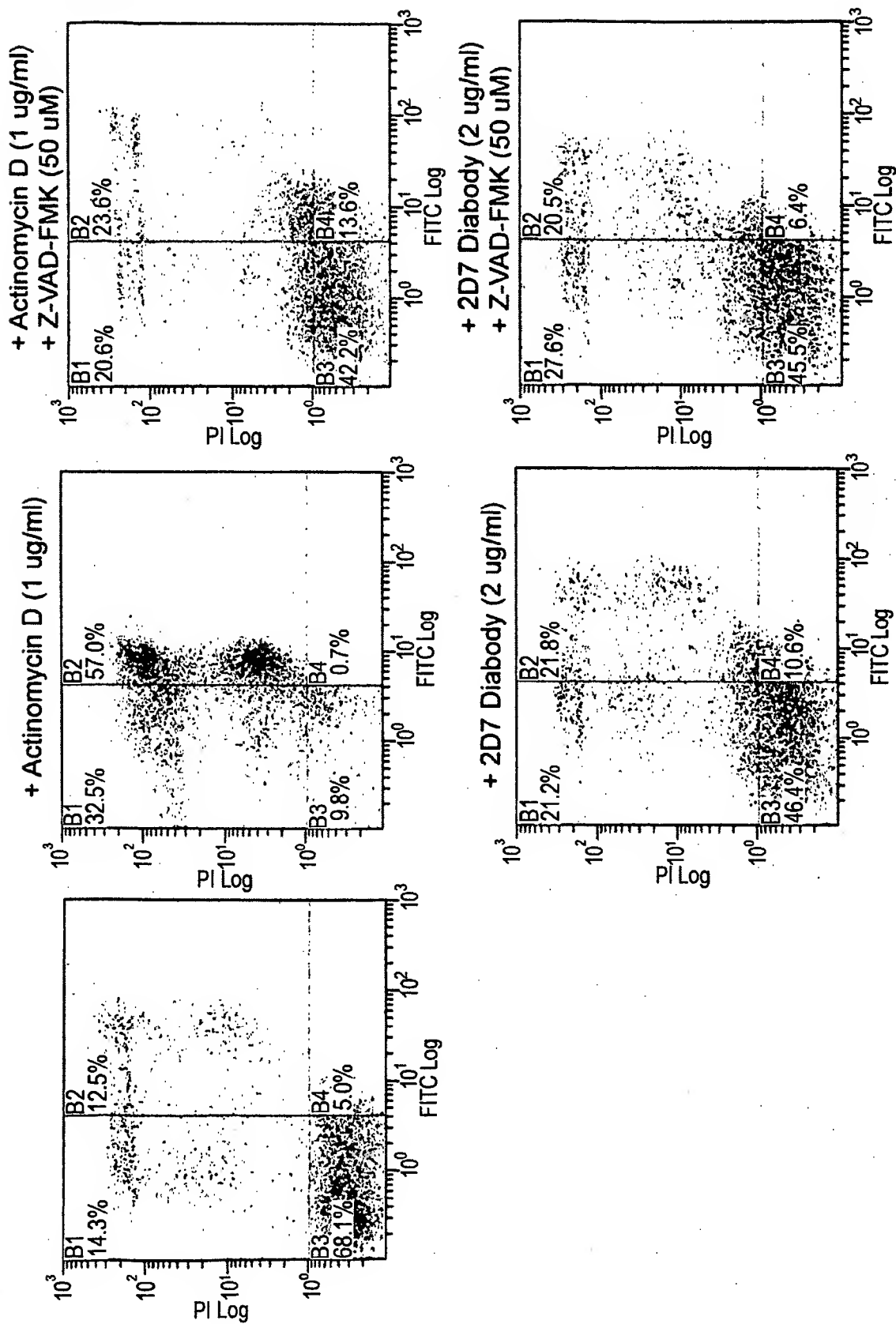
28 / 37

19



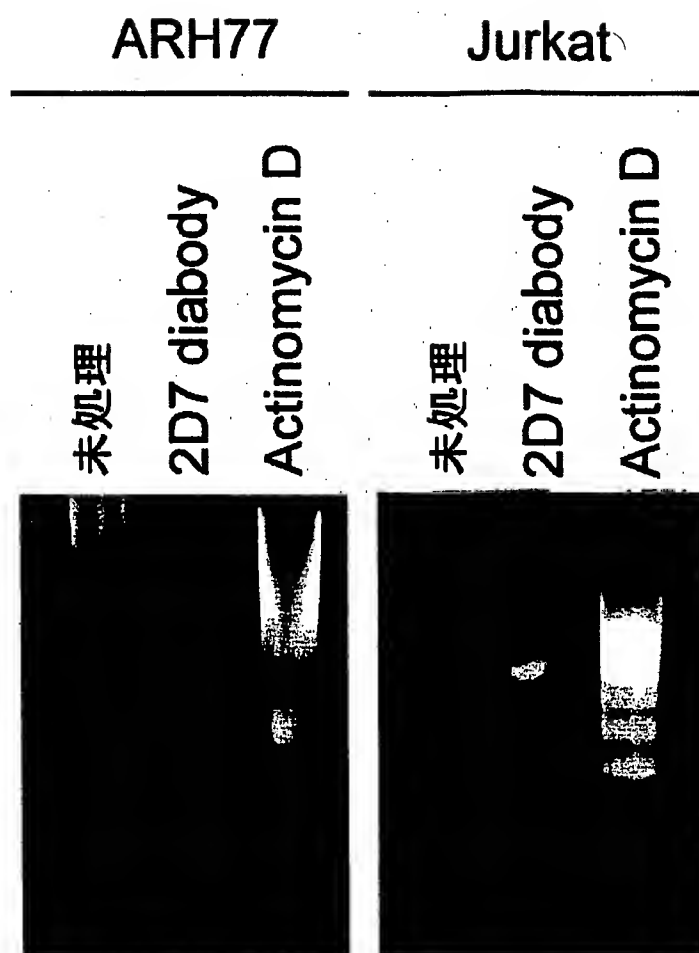
29 / 37

20



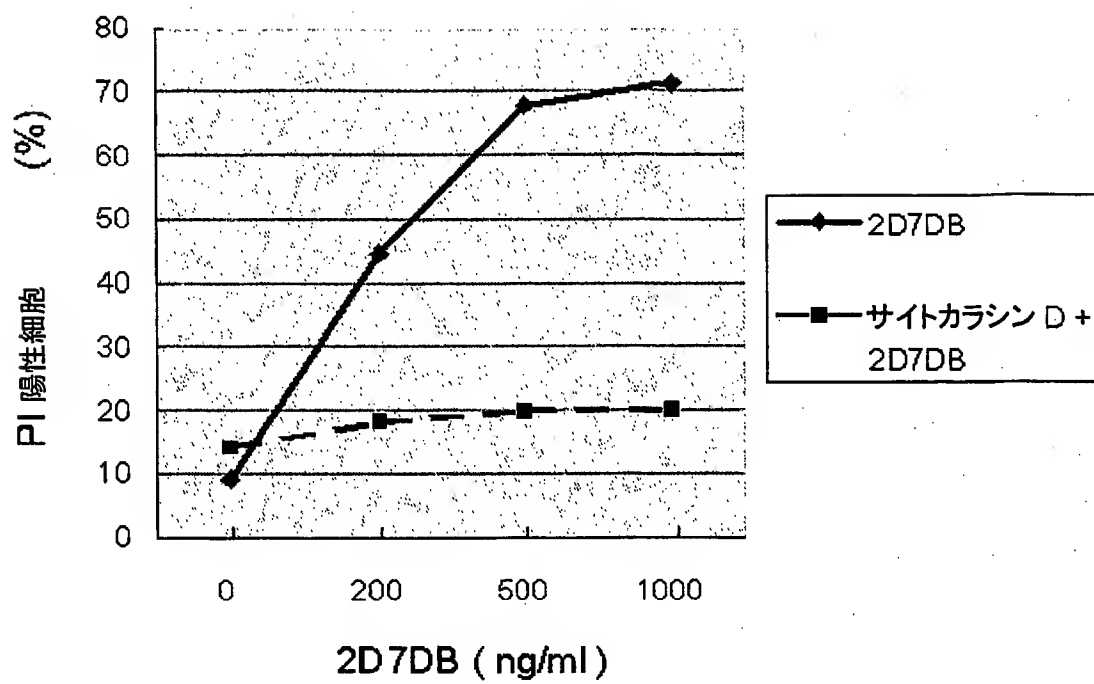
30/37

図 2 1



31 / 37

図 2 2



32 / 37

図 23

非処理

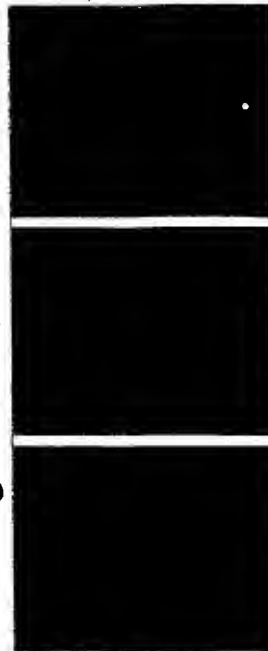
2D7DB

15 分

サイトカリン D  
+

2D7DB

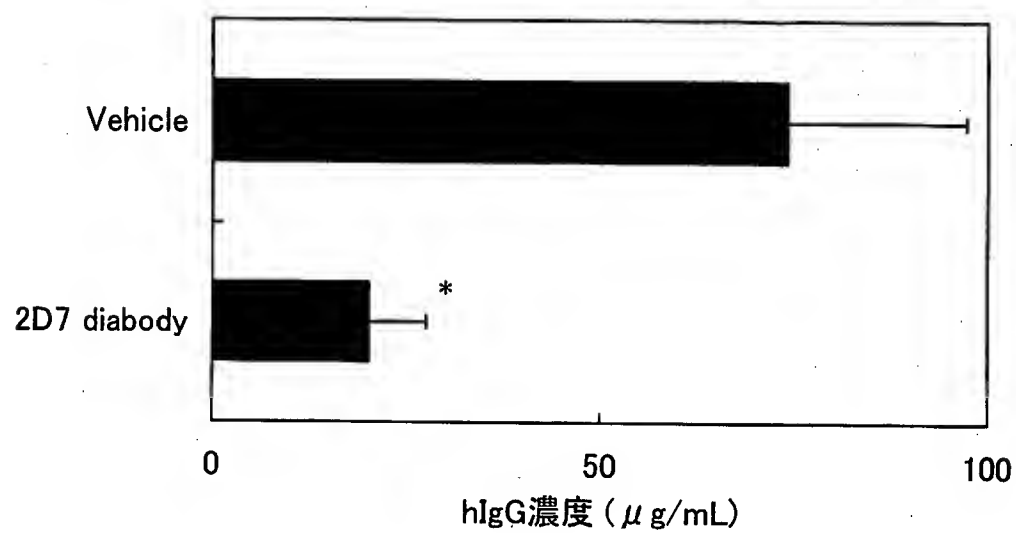
15 分





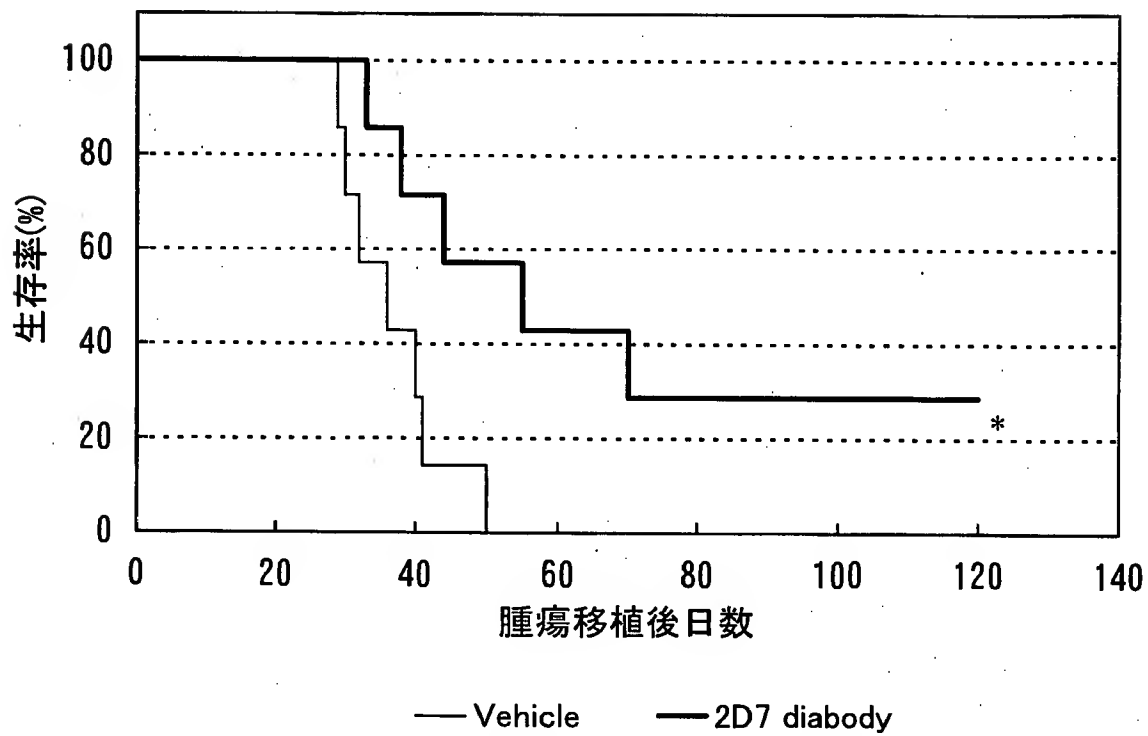
33/37

図 2 4



34/37

図 25



35 / 37

図 26 A

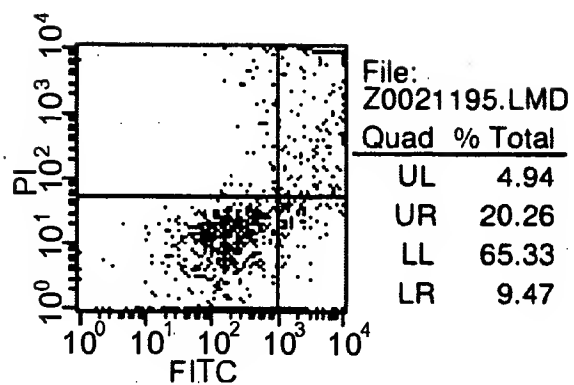
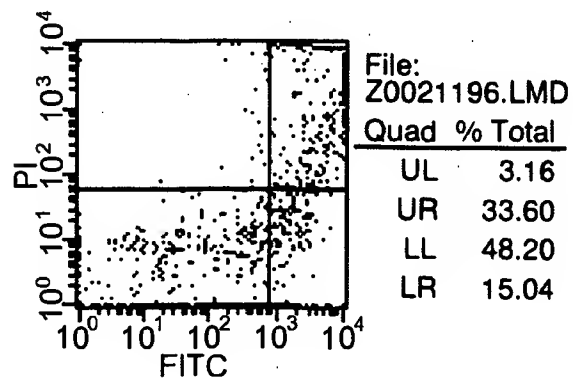
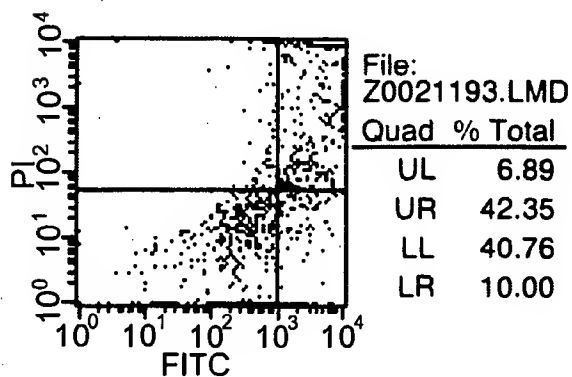
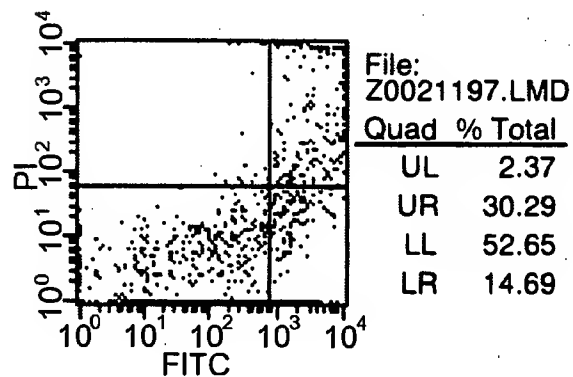
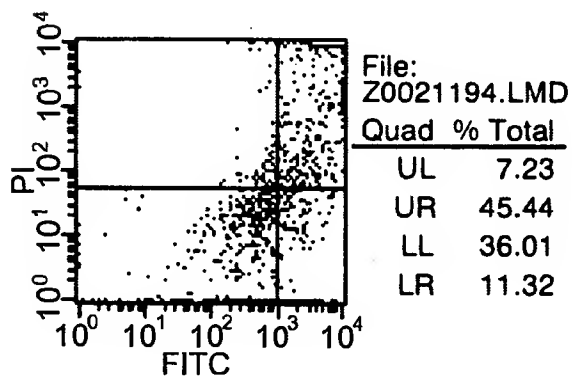
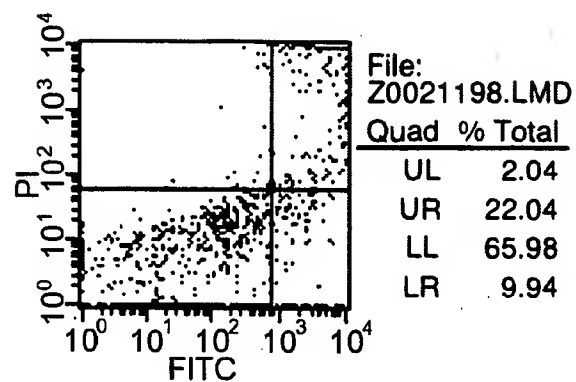


図 26 B



36 / 37

図 26 C

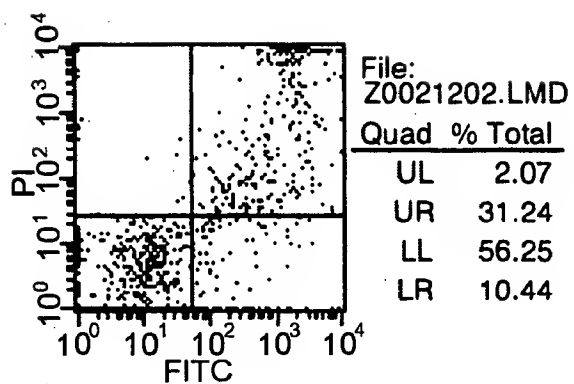
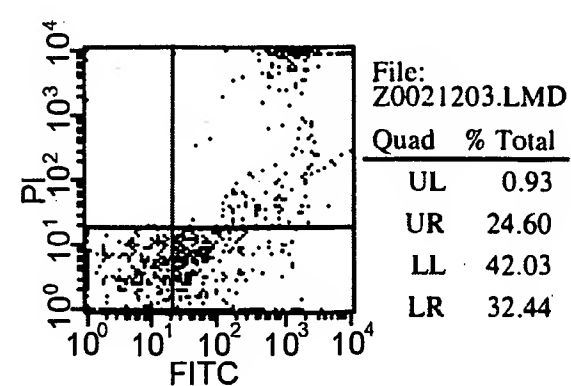
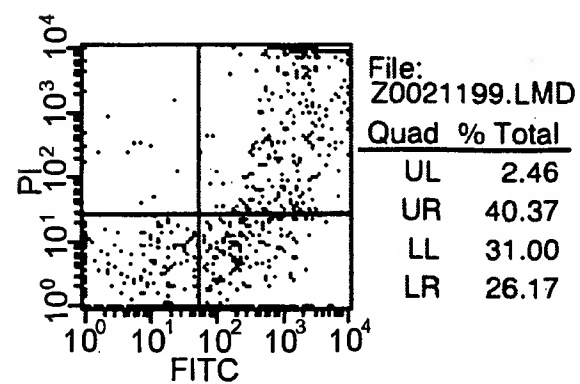
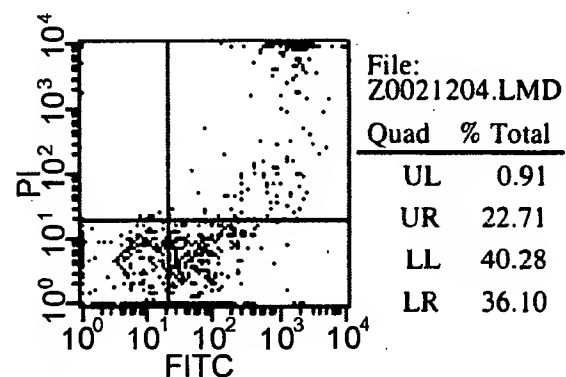
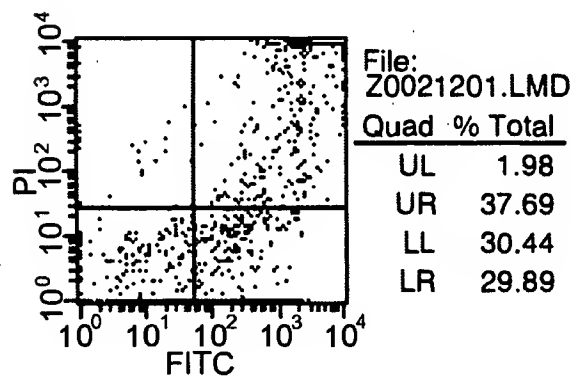
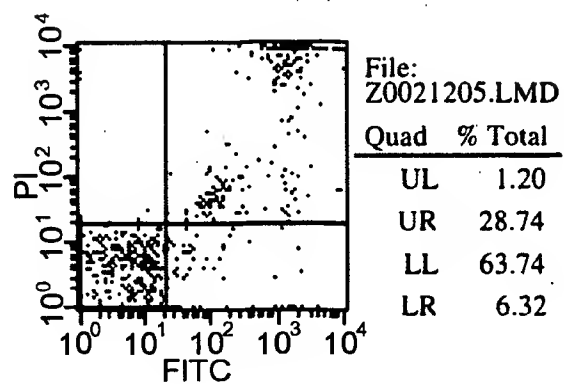
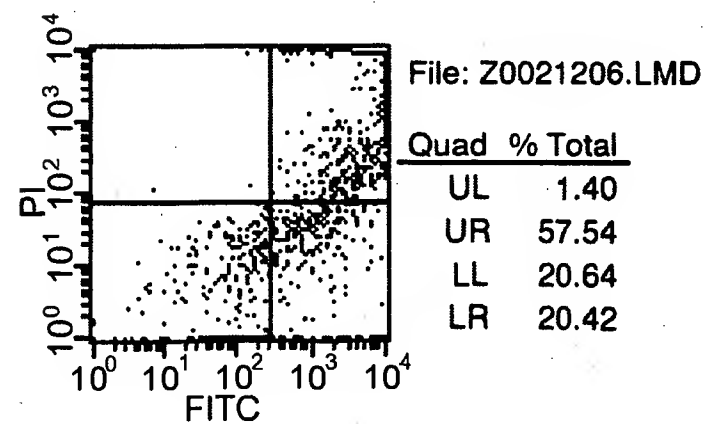
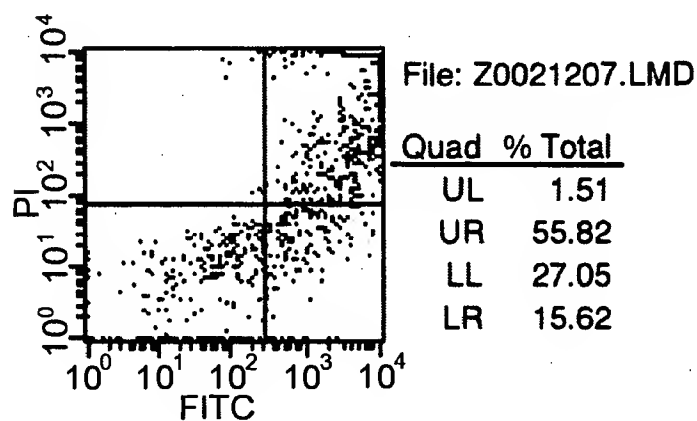
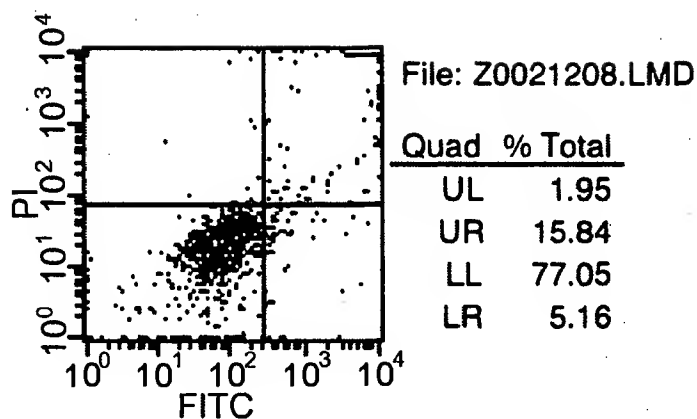


図 26 D



37 / 37

図 26E



1 / 17

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

OZAKI Shuji

ABE Masahiro

<120> Inducer Of Cell Death

<130> C1-A0220P

<140>

<141>

<150> JP 2002-299289

<151> 2002-10-11

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 547

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

2 / 17

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (103)..(546)

&lt;400&gt; 1

tacgactcac tatagggcaa gcagtggat caacgcagag tacgoggga atctatgatc 60

agtgtcctct ctacacagtc cctgacgaca ctgactccaa cc atg cga tgg agc 114

Met Arg Trp Ser

1

tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca ata act gca ggt gtc cat tgc cag 162

Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln

5

10

15

20

gtc cag ttg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct tca 210

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

25

30

35

gtg aag atg tct tgt aag gct tct ggc tac acc ttc aca gac tac ttt 258

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe

40

45

50

ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt gaa tgg att gga 306

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

3 / 17

tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat gag aag ttc agg 354

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg

70

75

80

ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac att 402

Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile

85

90

95

100

ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg tat ttc tgt gta 450

Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val

105

110

115

agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc act ctc aca gtc 498

Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

120

125

130

tcc tca gcc aaa aca aca ccc cca tca gtc tat cca ctg gcc cct gct g 547

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Ala

135

140

145

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 148

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus



4 / 17

&lt;400&gt; 2

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn

65

70

75

80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met

100

105

110

Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115

120

125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro

5 / 17

130

135

140

Leu Ala Pro Ala

145

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (103).. (534)

&lt;400&gt; 3

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggactwatg 60

agaatagcag taattagcta gggaccaaaa ttcaaagaca aa atg cat ttt caa 114

Met His Phe Gln

1

gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca gtc atc atg tcc 162

Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser

5

10

15

20

6 / 17

aga gga caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct gca tct 210

Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

25

30

35

cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt 258

Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser

40

45

50

tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa ctc tgg 306

Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp

55

60

65

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc ttc agt 354

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

70

75

80

ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag 402

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu

85

90

95

100

gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt tat cca 450

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro

105

110

115

ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa cgg gct gat gct 498

Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

7 / 17

120

125

130

gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag c

535

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

135

140

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 144

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1

5

10

15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

20

25

30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser

35

40

45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe

50

55

60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

8 / 17

65	70	75	80
Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
	85	90	95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg			
	100	105	110
Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	115	120	125
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
	130	135	140

<210> 5

<211> 789

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

**<220>**

<221> CDS

<222> (14).. (775)

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

9 / 17

&lt;400&gt; 5

cctgaattcc acc atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca 49

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser

1

5

10

ata act gca ggt gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct 97

Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro

15

20

25

gag ctg gtg aag cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct 145

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

30

35

40

ggc tac acc ttc aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct 193

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro

45

50

55

60

gga cag gga ctt gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act 241

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr

65

70

75

act gat tac aat gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac 289

Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp

80

85

90

aaa tcc tcc agc aca gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag 337

10 / 17

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu

95

100

105

gac tct gcg atg tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg 385

Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp

110

115

120

ggc cag ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc caa 433

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

125

130

135

140

att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct gca tct cca ggg gag 481

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu

145

150

155

aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg cac 529

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

160

165

170

tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa ctc tgg att tat agc 577

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser

175

180

185

aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc ttc agt ggc agt gga 625

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly

190

195

200

11/17

tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa gat 673

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp

205

210

215

220

gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt tat cca ccc acg ttc 721

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe

225

230

235

ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac tac aag gat gac gac gat 769

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

240

245

250

aag tga taagcggccg caat

789

Lys

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 253

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized peptide sequence



1 2 / 1 7

&lt;400&gt; 6

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
1 5 10 15  
Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
20 25 30  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45  
Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60  
Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
65 70 75 80  
Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95  
Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
100 105 110  
Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
115 120 125  
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr  
130 135 140  
Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile  
145 150 155 160  
Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln  
165 170 175  
Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
180 185 190  
Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

13 / 17

195 200 205  
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
210 215 220  
Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
225 230 235 240  
Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
245 250

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized adapter sequence

&lt;400&gt; 7

aattcccagc acagtggtag ataagtaag

29

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

14/17

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized adapter sequence

&lt;400&gt; 8

tcgacttact tatctaccac tgtgctggg

29

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

caggggccag tggatagact gatg

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

15 / 17

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

gctcactgga tggtaggaag atg

23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 11

cctgaattcc accatgcgat ggagctggat ctttc

35

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

16 / 17

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

aatttgcta ccgcctccac ctgaggagac tgtgagagtg gtgccct

47

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

tcctcaggtg gaggcggtag ccaaattgtt ctcacccagt cgccagc

47

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 68

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

17 / 17

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14

attgcggccg cttatcactt atcgctgtca tcctttagt cttttatctc caactttgtc 60

cccgagcc

68

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/13063

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/18, C12P21/08, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/02,  
A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/18, C12P21/08, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/02,  
A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlusu (JOIS),  
GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	GENESTIER L. et al., Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I $\alpha 1$ domain., Blood 1997, Vol.90, No.9, pages 3629 to 3639	1-3 4-23
X A	MATSUOKA S. et al., A novel type of cell death of lymphocytes induced by monoclonal antibody without participation of complement., J.Exp.Med.1995, Vol.181, No.6, pages 2007 to 2015	1-3 4-23
X A	FAYEN J. et al., Negative signaling by anti-HLA class I antibodies is dependent upon two triggering events., Int.Immunol.1998, Vol.10, No.9, pages 1347 to 1358	1-3 4-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 November, 2003 (05.11.03)	Date of mailing of the international search report 18 November, 2003 (18.11.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13063

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ONO K. et al., The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity., Mol.Immunol. 1999, Vol.36, No.6, pages 387 to 395	1-4 5-23
Y A	OHTOMO T. et al., Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells., Biochem. Biophys.Res.Comm.1999, Vol.258, No.3, pages 583 to 591	1-4 5-23
Y A	OZAKI S. et al., Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells., Blood 1999, Vol.93, No.11, pages 3922 to 3930	1-4 5-23



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	GENESTIER L. et al, Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I $\alpha$ 1 domain. Blood 1997, Vol. 90, No. 9, p. 3629-3639	1-3 4-23
X A	MATSUOKA S. et al, A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement. J. Exp. Med. 1995, Vol. 181, No. 6, p. 2007-2015	1-3 4-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.11.03

国際調査報告の発送日

18.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	FAYEN J. et al, Negative signaling by anti-HLA class I antibodies is dependent upon two triggering events. Int. Immunol. 1998, Vol. 10, No. 9, p. 1347-1358	1-3 4-23
Y A	ONO K. et al, The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. Mol. Immunol. 1999, Vol. 36, No. 6, p. 387-395	1-4 5-23
Y A	OHTOMO T. et al, Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, Vol. 258, No. 3, p. 583-591	1-4 5-23
Y A	OZAKI S. et al, Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells. Blood 1999, Vol. 93, No. 11, p. 3922-3930	1-4 5-23

## DESCRIPTION

## CELL DEATH-INDUCING AGENT

5           The present invention relates to minibodies of antibodies that recognize HLA.

Background Art

          The HLA class I antigen is formed by a heterodimer of a 45-KD  $\alpha$  chain comprising three domains ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), and a 12-KD  $\beta 2$  microglobulin. The main role of the HLA  
10       molecule is to present CD8<sup>+</sup>T cells with antigenic peptides, formed from about eight to ten amino acids produced inside cells. As such, it plays a very important role in the immune response and immune tolerance induced by this peptide presentation.

          By ligating HLA class IA antigens with antibodies, cell growth-suppressing and cell death-inducing effects have been observed in lymphocytes, suggesting that HLA molecules may  
15       also be signal transduction molecules.

          More specifically, for example, there are reports showing cell growth suppression of activated lymphocytes by the B9.12.1 antibody against the  $\alpha 1$  domain of human HLA class IA, the W6/32 antibody against the  $\alpha 2$  domain, and the TP25.99 and A1.4 antibodies against the  $\alpha 3$  domain (non-patent literature 1, 2). Furthermore, two types of antibodies, MoAb90 and  
20       YTH862, against the  $\alpha 1$  domain have been reported to induce apoptosis in activated lymphocytes (non-patent literature 2, 3, 4). Apoptosis induced by these two antibodies has been shown to be a caspase-mediated reaction (non-patent literature 4), and therefore, HLA class IA antigens expressed in lymphocytes are also speculated to be involved in apoptosis signal transduction.

25       Furthermore, the 5H7 antibody against the  $\alpha 3$  domain of human HLA class IA (non-patent literature 5), and the RE2 antibody against the  $\alpha 2$  domain of mouse HLA class IA (non-patent literature 6) have been also reported to induce cell death in activated lymphocytes and the like. However, in contrast with the aforementioned apoptosis-inducing antibodies MoAb90 and YTH862, none of the cell deaths induced by these antibodies have been shown to  
30       be mediated by caspase. Accordingly, cell deaths due to 5H7 and RE2 are predicted to be of a type completely different from conventionally known apoptosis mechanisms.

          As described above, there are numerous reports of the cell growth-suppressing actions and cell death-inducing actions of anti-HLA antibodies. However, the antibodies used herein are all in the molecular forms of IgG antibodies, F(ab')<sub>2</sub>, or Fab. To date there have been no  
35       reports that cell death-inducing activity is enhanced by reducing the molecular weight of antibodies, as in F(ab')<sub>2</sub> and Fab.

The 2D7 antibody is a mouse monoclonal antibody obtained by immunizing Balb/c mice with human myeloma cells (non-patent literature 7). The 2D7 antibody has been observed to bind very specifically to the cell surface of various lymphoid tumor cells, however, antigens recognized by the 2D7 antibody have not been identified.

5 Prior art literature relating to the present invention of this application is shown below.

[Non-patent Document 1] Fayen *et al.*, Int. Immunol. 10: 1347-1358(1998)

[Non-patent Document 2] Genestier *et al.*, Blood 90: 3629-3639 (1997)

[Non-patent Document 3] Genestier *et al.*, Blood 90: 726-735 (1997)

[Non-patent Document 4] Genestier *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 5060-5066 (1998)

10 [Non-patent Document 5] Woodle *et al.*, J. Immunol. 158: 2156-2164 (1997)

[Non-patent Document 6] Matsuoka *et al.*, J. Exp. Med. 181: 2007-2015 (1995)

[Non-patent Document 7] Goto, *et al.* Blood 84: 1922 (1994)

#### Disclosure of the Invention

15 The primary purpose of this invention is to provide minibodies of antibodies that recognize HLA class IA. A further objective of this invention is to provide novel therapeutic agents for tumors or autoimmune diseases that utilize these minibodies.

To identify antigens of the 2D7 antibody, the present inventors used random hexamers to synthesize cDNAs from the mRNAs purified from the 2D7 antigen-expressing cells,  
20 RPMI8226. These were inserted into the retrovirus vector, pMX, and a retroviral expression library was produced. The retrovirus expression library was packaged into a retrovirus by transfection into BOSC23 cells. 2D7 antigens were screened by infecting NIH3T3 cells with the virus thus obtained, staining these with 2D7 antibody, and then using FACS to perform expression analysis. Cell lysates were then prepared from RPMI8226 cells and U266 cells  
25 expressing the 2D7 antigen, and 2D7 antigens were identified by immunoprecipitation. As a result of these examinations, 2D7 antigens were proven to be HLA class I molecules.

Since the molecules recognized by 2D7 antibodies are HLA class IA, the present inventors examined whether 2D7 antibodies have cell death-inducing activity. More specifically, Jurkat cells were cultured in the presence or absence of 2D7, with anti-mouse IgG  
30 antibody also added. Cell nuclei were stained 48 hours later with Hoechst 33258, and then checked for cell nuclei fragmentation, which is characteristic of dead cells. As a result, hardly any cell death-inducing activity was observed in Jurkat cells with 2D7 antibody alone; however, by further cross-linking the antibody with anti-mouse IgG antibody, nuclei fragmentation was observed, a showing confirming that cell death was induced.

35 As described, because cross-linking with an anti-mouse IgG antibody is necessary for 2D7 antibody to induce cell death, it is difficult to clinically apply the 2D7 antibody to tumors or

autoimmune diseases. Therefore, the present inventors examined the effect of reducing the molecular weight of the 2D7 antibody on cell death induction. More specifically, genes encoding the variable regions of the 2D7 antibody were cloned from hybridomas. The 2D7 antibody was then made into diabodies using genetic engineering techniques and the effects on cell death-inducing activity was examined. Surprisingly, the 2D7 antibody converted to diabodies showed strong cell death-inducing activity within a very short time and at low doses, even without cross-linking with an anti-mouse IgG antibody. Furthermore, the diabody hardly acted on normal peripheral blood-derived lymphocytes and adherent cells, and specifically induced cell death in various myeloma cells, T cell leukemia cell lines, and activated lymphocytes. The above-mentioned results show that the minibodies of antibodies recognizing HLA can be utilized as cell death-inducing agents.

More specifically, the present invention provides the following [1] to [23]:

- [1] a minibody that recognizes a human leukocyte antigen (HLA);
- [2] the minibody of [1], wherein the HLA is an HLA class I;
- 15 [3] the minibody of [2], wherein the HLA class I is an HLA-A;
- [4] a minibody derived from a 2D7 antibody;
- [5] the minibody of any one of [1] to [4], wherein the minibody is a diabody;
- [6] a minibody of any one of (a) to (d):
  - (a) a minibody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6;
  - 20 (b) a minibody functionally equivalent to the minibody of (a), and comprising an amino acid sequence with a substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6;
  - (c) a minibody comprising the amino acid sequences of CDRs of SEQ ID NOs: 2 and 4; and
  - 25 (d) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising an amino acid sequence with a substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence of the CDRs of SEQ ID NOs: 2 and 4;
- [7] a method for producing an HLA-recognizing antibody having increased activity by converting the HLA-recognizing antibody to a low-molecular-weight antibody;
- 30 [8] the method of [7], wherein the HLA is an HLA class I;
- [9] the method of [8], wherein the HLA class I is an HLA-A;
- [10] a method for producing a 2D7 antibody having increased activity by converting the 2D7 antibody to a low-molecular-weight antibody;
- [11] the method of any one of [7] to [10], wherein the conversion step comprises conversion to a diabody;
- 35 [12] the method of any one of [7] to [11], wherein the activity is a cell death-inducing activity

or a cell growth-suppressing activity;

[13] a cell death-inducing agent, comprising as an active ingredient the minibody of any one of [1] to [6], the minibody produced by the method of any one of [7] to [12], or a 2D7 antibody;

[14] the cell death-inducing agent of [13] that induces cell death of a B cell or T cell;

5 [15] the cell death-inducing agent of [14], wherein the B cell or T cell is an activated B cell or activated T cell;

[16] a cell growth-suppressing agent comprising as an active ingredient the minibody of any one of [1] to [6], the minibody produced by the method of any one of [7] to [12], or a 2D7 antibody;

10 [17] an antitumor agent comprising as an active ingredient the minibody of any one of [1] to [6], the minibody produced by the method of any one of [7] to [12], or a 2D7 antibody;

[18] the antitumor agent of [17], wherein the tumor is a blood tumor;

[19:] a therapeutic agent for an autoimmune disease, wherein the therapeutic agent comprises as an active ingredient the minibody of any one of [1] to [6], the minibody produced by the

15 method of any one of [7] to [12], or a 2D7 antibody;

[20] the cell death-inducing agent of any one of [13] to [15], wherein the antibody is a diabody;

[21] the cell growth-suppressing agent of [16], wherein the antibody is a diabody;

[22] the antitumor agent of [17] or [18], wherein the antibody is a diabody; and

[23] the therapeutic agent for autoimmune disease of [19], wherein the antibody is a diabody;

20 The present invention provides minibodies that recognize HLA. The minibodies of this invention are useful since their activity is elevated. Herein activity refers to a biological action that is caused by binding an antibody to an antigen. Specific examples include cell death-inducing actions, apoptosis-inducing actions, cell growth-suppressing actions, cell differentiation-suppressing actions, cell division-suppressing actions, cell growth-inducing  
25 actions, cell differentiation-inducing actions, cell division-inducing actions, and cell cycle-regulating actions. Cell death-inducing actions and cell growth-suppressing actions are preferred.

The cells that become the target of the above-mentioned actions, such as cell death-inducing actions and cell growth-suppressing actions, are not particularly limited, though  
30 hemocytes and suspended cells are preferred. Specific examples of hemocytes include lymphocytes (B cells, T cells), neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes (preferably activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC)), and myeloma cells, while lymphocytes (B cells, T cells), and myeloma cells are preferred, and T cells or B cells (particularly activated B cells or activated T cells) are most preferable. Suspended cells refer to cells that, when cultured,  
35 grow in a suspended state without adhering to the surface of culturing vessels of glass, plastic or the like. On the other hand, adherent cells refer to cells that, when cultured, adhere to the

surface of culturing vessels of glass, plastic or the like.

In the present invention, administration of the minibodies that recognize HLA can treat or prevent diseases such as tumors including blood tumors (hematopoietic tumors) (specific examples include leukemia, myelodysplastic syndrome, malignant lymphoma, chronic  
5 myelogenous leukemia, plasmacytic disorder (myeloma, multiple myeloma, macroglobulinemia), and myeloproliferative disease (polycythemia vera, essential thrombocythemia, idiopathic myelofibrosis)), and autoimmune diseases (specific examples include rheumatism, autoimmune hepatitis, autoimmune thyroiditis, autoimmune bullous, autoimmune adrenocortical disease, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenic purpura, autoimmune atrophic  
10 gastritis, autoimmune neutropenia, autoimmune orchitis, autoimmune encephalomyelitis, autoimmune receptor disease, autoimmune infertility, Crohn's disease, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, Basedow's disease, juvenile diabetes, Addison's disease, myasthenia gravis, lens-induced uveitis, psoriasis, and Behcet's disease).

In the present invention, HLA refers to human leukocyte antigen. HLA molecules are  
15 categorized into class I and class II. Known examples of class I are HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, and such; and known examples of class II are HLA-DR, DQ, DP, and such. The antigens recognized by the antibodies of this invention are not particularly limited, so long as they are HLA molecules, preferably molecules classified as class I, and more preferably HLA-A.

In the present invention, a minibody comprises an antibody fragment that lacks a  
20 portion of a whole antibody (for example, whole IgG). The minibodies of the present invention are not particularly limited so long as they can bind an antigen. There are no particular limitations on the antibody fragments of the present invention, so long as they are portions of a whole antibody, and preferably contain a heavy chain variable region (VH) or a light chain variable region (VL). More preferably, the antibody fragments contain both a heavy chain  
25 variable region (VH) and a light chain variable region (VL). Specific examples of the antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, and scFv (single chain Fv), but are preferably scFv (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenburt and Moore Ed., Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). Such antibody fragments can be prepared by treating an  
30 antibody with an enzyme, such as papain or pepsin for example, to generate antibody fragments, or by constructing genes that encode these antibody fragments, introducing them into expression vectors, and then expressing them in appropriate host cells (see, for example, Co, M. S. *et al.*, 1994, J. Immunol. 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., 1989, Methods Enzymol. 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., 1989, Methods Enzymol. 178, 497-515; Lamoyi, E.,  
35 1986, Methods Enzymol. 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, 1986, Methods Enzymol. 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., 1991, Trends Biotechnol. 9, 132-137).

The minibodies of this invention preferably have smaller molecular weights than a whole antibody, however, they may form multimers, including dimers, trimers, and tetramers, and the molecular weights may become greater than that of the whole antibody.

5 A preferred minibody of this invention is an antibody comprising two or more antibody VHs and two or more antibody VLs, in which each of these variable regions is linked directly or indirectly via linkers and such. Such linkages may be covalent bonds or non-covalent bonds, or may be both. An even more preferable minibody is an antibody comprising two or more VH-VL pairs formed by non-covalent bonding between VH and VL. In this case, the distance between one VH-VL pair and another VH-VL pair is preferably shorter in a minibody than in a whole antibody.

10 A particularly favorable minibody of this invention is a diabody. A diabody is a dimer formed by bonding two fragments, in which a variable region is linked to another variable region via a linker and such (for example, scFv) (hereinafter referred to as diabody-constituting fragments), and usually comprises two VLs and two VHs (P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993); EP404097; WO93/11161; Johnson *et al.*, Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991); Holliger *et al.*, Protein Engineering, 9, 299-305, (1996); Perisic *et al.*, Structure, 2, 1217-1226, (1994); John *et al.*, Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999); Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993); Atwell *et al.*, Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996)). The bonds between the diabody-constituting fragments may be non-covalent or covalent bonds, but are preferably non-covalent bonds.

20 Alternatively, diabody-constituting fragments may be bound by a linker and such to form a single chain diabody (sc diabody). In such cases, linking the diabody-constituting fragments using a long linker of about 20 amino acids allows diabody-constituting fragments on the same chain to form a dimer via non-covalent bonds to each other.

25 Diabody-constituting fragments include those with a linked VL-VH, linked VL-VL, and linked VH-VH, and are preferably those with a linked VH-VL. In the diabody-constituting fragments, the linker used to link a variable region to a variable region is not particularly limited, but is preferably a linker short enough to prevent non-covalent bonding between variable regions in the same fragment. The length of such a linker can be appropriately determined by those skilled in the art, and is ordinarily 2 to 14 amino acids, preferably 3 to 9 amino acids, and most preferably 4 to 6 amino acids. In this case, linkers between a VL and VH encoded on the same fragment are short, and thus a VL and VH on the same strand do not form a non-covalent bond nor a single-chain V region fragment, rather, the fragment forms a dimer with another fragment via non-covalent bonding. Furthermore, according to the same principle as in diabody construction, three or more diabody-constituting fragments may be bonded to form multimeric antibodies, such as trimers and tetramers.



Examples of the diabodies of this invention are, without limitation, a diabody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, or a diabody that is functionally equivalent to a diabody comprising the sequence of SEQ ID NO: 6, which comprises an amino acid sequence with a mutation (substitution, deletion, insertion, and/or addition) of one or more amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; and a diabody comprising the amino acid sequence of a complementarity-determining region (CDR) (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4, or a diabody that is functionally equivalent to a diabody comprising the amino acid sequence of a CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4, which comprises an amino acid sequence with mutations (substitution, deletion, insertion, and/or addition) of one or more amino acids in the amino acid sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4.

Herein, "functionally equivalent" means that the diabody of interest has an activity equivalent to an activity of a diabody comprising the sequence of SEQ ID NO: 6, or a diabody comprising the sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4 (for example, HLA-A binding activity, and cell death-inducing activity).

The number of mutated amino acids is not limited, but may ordinarily be 30 amino acids or less, preferably 15 amino acids or less, and more preferably five amino acids or less (for example, three amino acids or less).

Furthermore, a diabody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, or a diabody comprising the sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4 may be humanized or chimerized to reduce heterologous antigenicity against humans.

In the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, amino acids 1 to 134 correspond to the variable region, amino acids 50 to 54 correspond to CDR1, amino acids 69 to 85 correspond to CDR2, and amino acids 118 to 134 correspond to CDR3. In the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4, amino acids 1 to 128 correspond to the variable region, amino acids 46 to 55 correspond to CDR1, amino acids 71 to 77 correspond to CDR2, and amino acids 110 to 128 correspond to CDR3.

In the present invention, the HLA-recognizing minibodies specifically bind to HLA. They are not particularly limited, so long as they have a biological action. The minibodies of this invention can be prepared by methods well known to those skilled in the art. For example, as described in the Examples, the antibodies can be prepared based on the sequence of an HLA-recognizing antibody (particularly sequences of the variable regions and sequences of CDRs), using genetic engineering techniques known to those skilled in the art.

For the sequence of the HLA-recognizing antibody, a well-known antibody sequence can be used, or an anti-HLA antibody can be prepared by a method well known to those skilled in the art using HLA as the antigen, and then the sequence of this antibody can be obtained and then used. Specifically, for example, this can be performed as follows: HLA protein or its  
5 fragment is used as a sensitizing antigen to perform immunizations according to conventional immunization methods, the obtained immunocytes are fused with well-known parent cells according to conventional cell fusion methods, and monoclonal antibody-producing cells (hybridomas) are then screened by ordinary screening methods. Antigens can be prepared by known methods, such as a method using baculoviruses (WO98/46777 and such). Hybridomas  
10 can be prepared, for example, according to the method of Milstein *et al.* (Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73:3-46). When the antigen has low immunogenicity, immunization can be performed using the antigen bound to immunogenic macromolecules, such as albumin. Thereafter, cDNAs of the variable region (V region) of the antibody are synthesized from the mRNAs of the hybridomas using reverse transcriptase, and the sequences  
15 of the obtained cDNAs can be determined by known methods.

Antibodies that recognize HLA are not particularly limited, so long as they bind to HLA; mouse antibodies, rat antibodies, rabbit antibodies, sheep antibodies, human antibodies, and such may be used as necessary. Alternatively, artificially modified, genetically recombinant antibodies, such as chimeric and humanized antibodies, may be used to reduce  
20 heterologous antigenicity against humans. These modified antibodies can be produced using known methods. A chimeric antibody is an antibody comprising the variable regions of the heavy and light chains of an antibody from a non-human mammal such as a mouse, and the constant regions of the heavy and light chains of a human antibody. The chimeric antibody can be produced by linking a DNA encoding the variable regions of the mouse antibody with a DNA  
25 encoding the constant regions of the human antibody, incorporating this into an expression vector, and then introducing the vector to a host.

Humanized antibodies are also referred to as "reshaped human antibodies". Such humanized antibodies are obtained by transferring the CDR of an antibody derived from a non-human mammal, for example a mouse, to the CDR of a human antibody, and general gene recombination procedures for this are also known. Specifically, a DNA sequence designed to  
30 link a murine antibody CDR to the framework region (FR) of a human antibody can be synthesized by PCR, using primers prepared from several oligonucleotides containing overlapping portions of terminal regions. The obtained DNA is linked to a DNA encoding human antibody constant regions, and this is then integrated into an expression vector, and the  
35 antibody is produced by introducing this vector into host cells (see European Patent Application EP 239400, and International Patent Application WO 96/02576). The human antibody FR to be

linked via the CDR is selected so the CDR forms a favorable antigen-binding site. To form a suitable antigen-binding site, amino acids in the framework region of the antibody variable region may be substituted in the CDR of the reshaped human antibody, as necessary (Sato, K. *et al.*, 1993, Cancer Res. 53, 851-856).

5           These chimeric antibodies and humanized antibodies can be chimerized, humanized, and such after their molecular weight is reduced, or their molecular weight can be reduced after they have been chimerized, humanized, or such.

          Methods for obtaining human antibodies are also known. For example, human lymphocytes can be sensitized *in vitro* with a desired antigen, or with cells expressing the desired antigen, and the sensitized lymphocytes can be fused with human myeloma cells, such as U266, to obtain the desired human antibody with antigen-binding activity (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 1-59878). Further, a desired human antibody can be obtained by using a desired antigen to immunize transgenic animals that have a full repertoire of human antibody genes (see International Patent Application WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735). Furthermore, techniques for obtaining human antibodies by panning using a human antibody library are also known. For example, variable regions of human antibodies can be expressed as single chain antibodies (scFvs) on the surface of phages using phage display methods, and phages that bind to antigens can be selected. The DNA sequences that encode the variable regions of the human antibodies binding the antigens can be determined by analyzing the genes of the selected phages. By determining the DNA sequences of the scFvs that bind to the antigens, appropriate expression vectors carrying relevant sequences can be produced to yield human antibodies. These methods are already known, and are detailed in the following publications: WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388.

25           In the present invention, favorable examples of antibodies that recognize HLA include 2D7 antibodies. Examples of 2D7 antibodies are antibodies comprising the sequences of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4, but are not limited thereto. The 2D7 antibodies of this invention include an antibody which is functionally equivalent to an antibody that comprises the sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4, and which comprises an amino acid sequences with a mutation (substitution, deletion, insertion, and/or addition) of one or more amino acids in the amino acid sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4. Herein, "functionally equivalent" means that an antibody of interest has an activity (for example, HLA-A binding activity, and cell death-inducing activity) equivalent to an antibody comprising the sequence of a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 2 and a CDR (or a variable region) of SEQ ID NO: 4.

The number of mutated amino acids is not particularly limited, but may be ordinarily 30 amino acids or less, preferably 15 amino acids or less, and more preferably five amino acids or less (for example, three amino acids or less). The amino acids are preferably mutated or modified in a way that conserves the properties of the amino acid side chain. Examples of amino acid side chain properties are: hydrophobic amino acids (A, I, L, M, F, P, W, Y, and V), hydrophilic amino acids (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, and T), amino acids comprising the following side chains: aliphatic side chains (G, A, V, L, I, and P); hydroxyl-containing side chains (S, T, and Y); sulfur-containing side chains (C and M); carboxylic acid- and amide-containing side chains (D, N, E, and Q); basic side chains (R, K, and H); aromatic ring-containing side chains (H, F, Y, and W) (amino acids are represented by one-letter codes in parentheses). Polypeptides comprising a modified amino acid sequence, in which one or more amino acid residues is deleted, added, and/or replaced with other amino acids, are known to retain their original biological activities (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666 (1984); Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research 10, 6487-6500 (1982); Wang, A. *et al.*, Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6409-6413 (1982)). In addition, the amino acid sequences of the antibody constant regions and such are well known to those skilled in the art.

Furthermore, the 2D7 antibodies can be chimerized, humanized, or such by methods well known to those skilled in the art. Such chimeric and humanized antibodies are also included in the 2D7 antibodies of this invention.

The antibodies of this invention may be conjugated antibodies that are bonded to various molecules, such as polyethylene glycol (PEG), radioactive substances, and toxins. Such conjugate antibodies can be obtained by performing chemical modifications on the obtained antibodies. Methods for antibody modification are established in this field. The term "antibody" in this invention includes such conjugate antibodies.

The present invention includes DNAs that encode the antibodies of this invention. This invention also includes DNAs encoding antibodies that hybridize under stringent conditions to the aforementioned DNAs, and have antigen-binding capacity and activity. Hybridization techniques (Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) are well known to those skilled in the art, and hybridization conditions can be selected appropriately by those skilled in the art. Such hybridization conditions include, for example, conditions of low stringency. Examples of conditions of low stringency include post-hybridization washing in 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C, and preferably in 0.1x SSC and 0.1% SDS at 50°C. More preferable hybridization conditions include those of high stringency. Highly stringent conditions include, for example, washing in 5x SSC and 0.1% SDS at 65°C. In these conditions, the higher the temperature, the higher the expectation of efficiently obtaining

DNAs with a high homology. However, several factors, such as temperature and salt concentration, can influence hybridization stringency, and those skilled in the art can suitably select these factors to achieve similar stringencies.

The DNAs of this invention are used for *in vivo* and *in vitro* production of the antibodies of this invention, and for other applications, such as gene therapy. The DNAs of this invention may be in any form, so long as they encode the antibodies of this invention. More specifically, they may be cDNAs synthesized from mRNAs, genomic DNAs, chemically synthesized DNAs, or such. Furthermore, the DNAs of this invention include any nucleotide sequence based on the degeneracy of the genetic code, so long as they encode the antibodies of this invention.

The antibodies of this invention can be produced by methods well known to those skilled in the art. More specifically, a DNA of an antibody of interest is incorporated into an expression vector. In so doing, the DNA is incorporated into the expression vector and expressed under the control of an expression regulatory region such as an enhancer or promoter. Next, antibodies can be expressed by transforming host cells with this expression vector. In this regard, appropriate combinations of hosts and expression vectors can be used.

The vectors include, for example, M13 vectors, pUC vectors, pBR322, pBluescript, and pCR-Script. In addition to the above vectors, for example, pGEM-T, pDIRECT, and pT7 can also be used for the subcloning and excision of cDNAs.

When using vectors to produce the antibodies of this invention, expression vectors are particularly useful. When an expression vector is expressed in *E. coli*, for example, it should have the above characteristics in order to be amplified in *E. coli*. Additionally, when *E. coli* such as JM109, DH5  $\alpha$ , HB101, or XL1-Blue are used as the host cell, the vector preferably has a promoter, for example, a lacZ promoter (Ward *et al.* (1989) Nature 341:544-546; (1992) FASEB J. 6:2422-2427), araB promoter (Better *et al.* (1988) Science 240:1041-1043), or T7 promoter, to allow efficient expression of the desired gene in *E. coli*. Other examples of the vectors include pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (QIAGEN), pEGFP, and pET (where BL21, a strain expressing T7 RNA polymerase, is preferably used as the host).

Furthermore, the vector may comprise a signal sequence for polypeptide secretion. When producing proteins into the periplasm of *E. coli*, the pelB signal sequence (Lei, S. P. *et al.* J. Bacteriol. 169:4379 (1987)) may be used as a signal sequence for protein secretion. For example, calcium chloride methods or electroporation methods may be used to introduce the vector into a host cell.

In addition to *E. coli*, expression vectors derived from mammals (e.g., pCDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18(17):5322), pEF, pCDM8), insect cells (e.g., "Bac-to-BAC baculovirus expression system" (GIBCO-BRL), pBacPAK8), plants (e.g., pMH1, pMH2), animal viruses (e.g., pHSV, pMV, pAdexLcw), retroviruses (e.g., pZIPneo),

yeasts (e.g., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), and *Bacillus subtilis* (e.g., pPL608, pKTH50) may also be used as a vector for producing the polypeptide of the present invention.

5 In order to express proteins in animal cells, such as CHO, COS, and NIH3T3 cells, the vector preferably has a promoter necessary for expression in such cells, for example, an SV40 promoter (Mulligan *et al.* (1979) *Nature* 277:108), MMLV-LTR promoter, EF1 $\alpha$  promoter (Mizushima *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5322), CMV promoter, etc.). It is even more preferable that the vector also carry a marker gene for selecting transformants (for example, a drug-resistance gene enabling selection by a drug, such as neomycin and G418). Examples of  
10 vectors with such characteristics include pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13, and such.

In addition, to stably express a gene and amplify the gene copy number in cells, CHO cells having a defective nucleic acid synthesis pathway can be introduced with a vector containing a DHFR gene (for example, pCHOI) to compensate for the defect, and the copy  
15 number may be amplified using methotrexate (MTX). Alternatively, a COS cell, which carries an SV40 T antigen-expressing gene on its chromosome, can be transformed with a vector containing the SV40 replication origin (for example, pcD) for transient gene expression. The replication origin may be derived from polyoma viruses, adenoviruses, bovine papilloma viruses (BPV), and such. Furthermore, to increase the gene copy number in host cells, the expression  
20 vector may contain, as a selection marker, an aminoglycoside transferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E. coli* xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, dihydrofolate reductase (dhfr) gene, and such.

Methods for expressing the DNAs of this invention in the bodies of animals include methods of incorporating the DNAs of this invention into appropriate vectors and introducing  
25 them into living bodies by, for example, a retrovirus method, liposome method, cationic liposome method, or adenovirus method. The vectors that are used include adenovirus vectors (for example, pAdexlcw), and retrovirus vectors (for example, pZIPneo), but are not limited thereto. General genetic manipulations such inserting the DNAs of this invention into vectors can be performed according to conventional methods (Molecular Cloning, 5.61-5.63).  
30 Administration to living bodies can be carried out by *ex vivo* method or *in vivo* methods.

Furthermore, the present invention provides host cells into which a vector of this invention is introduced. The host cells into which a vector of this invention is introduced are not particularly limited; for example, *E. coli* and various animal cells are available for this purpose. The host cells of this invention may be used, for example, as production systems to  
35 produce and express the antibodies of the present invention. *In vitro* and *in vivo* production systems are available for polypeptide production systems. Production systems that use

eukaryotic cells or prokaryotic cells are examples of *in vitro* production systems.

Eukaryotic cells that can be used include, for example, animal cells, plant cells, and fungal cells. Known animal cells include: mammalian cells, for example, CHO (J. Exp. Med. (1995)108, 945), COS, 3T3, myeloma, BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, amphibian  
5 cells such as *Xenopus laevis* oocytes (Valle, *et al.* (1981) Nature 291, 358-340), or insect cells (e.g., Sf9, Sf21, and Tn5). CHO cells in which the DHFR gene has been deleted, such as dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) and CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275), are particularly preferable for use as CHO cells. Of the animal cells, CHO cells are particularly favorable for large-scale expression. Vectors can be introduced into  
10 a host cell by, for example, calcium phosphate methods, DEAE-dextran methods, methods using cationic liposome DOTAP (Boehringer-Mannheim), electroporation methods, lipofection methods, etc.

Plant cells include, for example, *Nicotiana tabacum*-derived cells known as polypeptide production systems. Calluses may be cultured from these cells. Known fungal cells include  
15 yeast cells, for example, the genus *Saccharomyces*, such as *Saccharomyces cerevisiae*; and filamentous fungi, for example, the genus *Aspergillus* such as *Aspergillus niger*.

Bacterial cells can be used in prokaryotic production systems. Examples of bacterial cells include *E. coli* (for example, JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 and such); and *Bacillus subtilis*.

Antibodies can be obtained by transforming the cells with a polynucleotide of interest,  
20 then culturing these transformants *in vitro*. Transformants can be cultured using known methods. For example, DMEM, MEM, RPMI 1640, or IMDM may be used as the culture medium for animal cells, and may be used with or without serum supplements such as fetal calf serum (FCS). Serum-free cultures are also acceptable. The preferred pH is about 6 to 8 over the course of culturing. Incubation is typically carried out at a temperature of about 30 to 40°C  
25 for about 15 to 200 hours. Medium is exchanged, aerated, or agitated, as necessary.

On the other hand, production systems using animal or plant hosts may be used as systems for producing polypeptides *in vivo*. For example, a DNA of interest may be introduced into an animal or plant, and the polypeptide produced in the body of the animal or plant is then recovered. The "hosts" of the present invention include such animals and plants.

30 When using animals, there are production systems using mammals or insects. Mammals such as goats, pigs, sheep, mice, and cattle may be used (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Alternatively, the mammals may be transgenic animals.

For example, a DNA of interest may be prepared as a fusion gene with a gene encoding a polypeptide specifically produced in milk, such as the goat  $\beta$ -casein gene. DNA fragments  
35 containing the fusion gene are injected into goat embryos, which are then introduced back to female goats. The desired antibody can then be obtained from milk produced by the transgenic

goats, which are born from the goats that received the embryos, or from their offspring. Appropriate hormones may be administered to increase the volume of milk containing the polypeptide produced by the transgenic goats (Ebert, K.M. *et al.*, Bio/Technology 12, 699-702 (1994)).

5           Insects, such as silkworms, may also be used. Baculoviruses carrying a DNA of interest can be used to infect silkworms, and the antibody of interest can be obtained from their body fluids (Susumu, M. *et al.*, Nature 315, 592-594 (1985)).

          When using plants, tobacco can be used, for example. When tobacco is used, a DNA of interest may be inserted into a plant expression vector, for example, pMON 530, and then the  
10          vector may be introduced into a bacterium, such as *Agrobacterium tumefaciens*. The bacteria are then used to infect tobacco, such as *Nicotiana tabacum*, and the desired polypeptides are recovered from the leaves (Julian K.-C. Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. 24, 131-138 (1994)).

          The resulting antibodies of this invention may be isolated from the inside or outside (such as the medium) of host cells, and purified as substantially pure and homogenous antibodies.  
15          Any standard method for isolating and purifying antibodies may be used, and methods are not limited to any specific method. Antibodies may be isolated and purified by selecting an appropriate combination of, for example, chromatographic columns, filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing, dialysis, recrystallization, and  
20          others.

          Chromatography includes, for example, affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse-phase chromatography, and adsorption chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,  
25          1996). These chromatographies can be carried out using liquid phase chromatographies such as HPLC and FPLC. The present invention also includes antibodies that are highly purified using these purification methods.

          In the present invention, the antigen-binding activity of antibodies (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) can be  
30          measured using well known techniques. For example, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), EIA (enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay), or fluoroimmunoassay may be used.

          In the present invention, whether or not the antibodies of this invention induce cell death in suspended cells can be determined from whether cell death is induced in Jurkat cells or  
35          ARH77 cells, as in the Examples. Whether or not the antibodies induce cell death in adhesion cells can be determined from whether cell death is induced in HeLa cells, as in the Examples.



Furthermore, the present invention provides cell death-inducing agents or cell growth-suppressing agents which comprise minibodies or 2D7 antibodies of this invention as active ingredients. The cell death-inducing activity of the minibodies or 2D7 antibodies in this invention is considered to have a particularly large effect on activated T cells or B cells, therefore, it is considered to be particularly effective for treatment and prevention of tumors such as cancer (particularly blood tumors), and autoimmune diseases. Accordingly, the present invention provides methods of treatment and prevention of tumors such as cancer (particularly blood tumors), and autoimmune diseases that use the minibodies or 2D7 antibodies of this invention. When using 2D7 antibodies whose molecular weight has not been reduced as active ingredients, they are preferably cross-linked with an anti-IgG antibody and such.

The above-mentioned antibodies can also be used as conjugate antibodies, after linking to various reagents. Examples of such reagents include chemotherapy reagents, radioactive substances, and toxins. Such conjugate antibodies can be produced by known methods (US5057313, and US5156840).

The above-mentioned pharmaceutical agents can be directly administered to patients, or administered as pharmaceutical compositions formulated by known pharmaceutical methods. For example, they may be administered orally, as tablets, capsules, elixirs, or microcapsules, sugar-coated as necessary; or parenterally, in the form of injections of sterile solution or suspensions prepared with water or other pharmaceutically acceptable liquids. For example, they may be formulated by appropriately combining them with pharmaceutically acceptable carriers or media, more specifically, sterilized water or physiological saline solutions, vegetable oils, emulsifiers, suspending agents, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives, binding agents, and such, and mixing them at a unit dosage form required for generally accepted pharmaceutical practice. The amount of active ingredient in the formulation is such that appropriate doses within indicated ranges are achieved.

Additives that can be mixed into tablets and capsules include, for example, binding agents such as gelatin, cornstarch, tragacanth gum, and gum arabic; excipients such as crystalline cellulose; swelling agents such as cornstarch, gelatin, alginic acid; lubricants such as magnesium stearate; sweeteners such as sucrose, lactose, or saccharine; and flavoring agents such as peppermint and *Gaultheria adenotheix* oils, or cherry. When the unit dosage form is a capsule, liquid carriers, such as oils and fats, can be further included in the above-indicated materials. Sterile compositions to be injected can be formulated using a vehicle such as distilled water used for injection, according to standard protocols.

Aqueous solutions used for injections include, for example, physiological saline and isotonic solutions comprising glucose or other adjunctive agents such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride. They may also be combined with appropriate solubilizing

agents, such as alcohol, and specifically, ethanol, polyalcohol such as propylene glycol or polyethylene glycol, or non-ionic detergent such as polysorbate 80<sup>TM</sup> or HCO-50, as necessary.

Oil solutions include sesame oils and soybean oils, and can be combined with solubilizing agents such as benzyl benzoate or benzyl alcohol. Injection solutions may also be formulated with buffers, for example, phosphate buffers or sodium acetate buffers; analgesics, for example, procaine hydrochloride; stabilizers, for example, benzyl alcohol or phenol; or anti-oxidants. The prepared injections are typically aliquoted into appropriate ampules.

Administration to patients may be performed, for example by intra-arterial injection, intravenous injection, or subcutaneous injection, alternatively by intranasal, transbronchial, intramuscular, transdermal, or oral administration using methods well known to those skilled in the art. Doses vary depending on the body weight and age of the patient, method of administration and such; nevertheless, those skilled in the art can appropriately select suitable doses. Furthermore, if a compound can be encoded by a DNA, the DNA may be incorporated into a gene therapy vector to carry out gene therapy. Doses and administration methods vary depending on the body weight, age, and symptoms of patients, but, again, they can be appropriately selected by those skilled in the art.

A single dose of a pharmaceutical agent of this invention varies depending on the target of administration, the target organ, symptoms, and administration method. However, an ordinary adult dose (presuming a body weight of 60 kg) in the form of an injection is approximately 0.1 to 1000 mg, preferably approximately 1.0 to 50 mg, and more preferably approximately 1.0 to 20 mg per day, for example.

When administered parenterally, a single dose varies depending on the target of administration, the target organ, symptoms, and administration method, but in the form of an injection, for example, a single dose of approximately 0.01 to 30 mg, preferably approximately 0.1 to 20 mg, and more preferably approximately 0.1 to 10 mg per day may be advantageously administered intravenously to an ordinary adult (presuming a body weight of 60 kg). For other animals, a converted amount based on the amount for a body weight of 60 kg, or a converted amount based on the amount for a body surface area can be administered.

### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the adaptors used to produce the pMX2 vector. The bold letters indicate BstXI recognition sequences.

Fig. 2A and Fig. 2B show 2D7 antigen expression in cell lines. Each cell type was stained with 2D7 antibody and their expressions were examined. (Solid line: no primary antibody; dotted line: 2D7 antibody)

Fig. 3 is a set of photographs showing the results of immunoprecipitation using the 2D7

antibody. NIH3T3, RPMI8226, and U266 cells were solubilized, immunoprecipitation was performed with the 2D7 antibody, anti-BST-1 antibody (control), or protein G itself, and the proteins were detected by silver staining. In RPMI8226 and U266, a molecule of approximately 12 KD (arrow), which is specifically precipitated by the 2D7 antibody, is detected.

5 This band was cut out and peptide sequenced, and thus found to be  $\beta$ 2-microglobulin.

Fig. 4 shows flow diagrams for screening. Separation into pools, preparation of DNA, packaging into virus, infection of 3T3 cells, and screening using FACS were performed in one span (Fig. 4A). By the end of the fourth screening, the library was narrowed down to approximately 20 clones. In the fifth screening, 64 colonies were individually inoculated into a 96-well plate, pools were formed using the vertical and horizontal rows, and then screened. As a result, the library was narrowed down to twelve candidate clones (Fig. 4B).

Fig. 5 shows the results of screening using FACS. Fig. 5A shows the results of the second screening, Fig. 5B shows the results of the third screening, and Fig. 5C shows the results of the fourth screening. NIH3T3 cells were infected with retroviruses prepared from each pool, and three days later the cells were stained with the 2D7 antibody. The clones were narrowed down by gradually reducing the pool size of each screening.

Fig. 6 shows the results of screening using FACS. Fig. 6A shows the results of the fifth screening, and Fig. 6B shows the result of the final screening. As a result of the fifth screening, positive clones were found in rows 3, 4, 6, and 8, and in rows E, F, and G. As a result of screening the twelve candidate clones, positive clones were found in row E at 6E. When the nucleotide sequence of this 6E was analyzed, it was found to encode HLA class I A\*6802.

Fig. 7 is a graph and a set of photographs showing the influence on cells of the addition of 2D7 antibody. 2D7 antibody (10  $\mu$ g/ml) was added, and the number of viable cells was determined 48 hours later. Hardly any change in cell growth was observed, even after 2D7 antibody was added (Fig. 7A). K562 cells (Fig. 7B), Jurkat cells (Fig. 7C), and RPMI8226 cells (Fig. 7D) were each observed 24 hours after antibody addition. The 2D7 antibody induced aggregation of Jurkat cells.

Fig. 8 is a set of photographs showing cell death induction due to cross-linking of the 2D7 antibody. Each combination of the 2D7 antibody with anti-mouse IgG was made to act on Jurkat cells, and the cell nuclei were stained 48 hours later. Nuclear fragmentation due to cell death was observed when the 2D7 antibody and anti-mouse IgG acted on cells simultaneously.

Fig. 9 shows a 2D7 diabody (2D7DB) sequence.

Fig. 10A and Fig. 10B show a 2D7 diabody structure. Fig. 10C is a photograph showing its transient expression in COS7 cells.

Fig. 11A and Fig. 11B show the cytotoxic activity of 2D7DB transiently expressed in

COS7.

Fig. 12 shows the cytotoxic activity of 2D7DB transiently expressed in COS7. K562 cells (Fig. 12A) and Jurkat cells (Fig. 12B) were used.

Fig. 13 shows the cytotoxic activity of 2D7DB transiently expressed in COS7.  
5 RPMI8226 cells (Fig. 13A), IL-KM3 cells (Fig. 13B), U266 cells (Fig. 13C), and ARH77 cells (Fig. 13D) were used.

Fig. 14 is a graph showing the growth-suppressing effect of purified 2D7DB.

Fig. 15 shows cell death induction by purified 2D7DB, 48 hours after induction.  
ARH77 cells (Fig. 15A), Jurkat cells (Fig. 15B), K562 cells (Fig. 15C), and HeLa cells (Fig.  
10 15D) were used.

Fig. 16 shows cell death induction by purified 2D7DB, 48 hours after induction. U266 cells (Fig. 16A), and IL-KM3 cells (Fig. 16B) were used for the study.

Fig. 17 shows a time course of cell death induction by 2D7DB (2 µg/ml). Cell death induction was investigated at 12 through to 38 hours. ARH77 cells (Fig. 17A) and Jurkat cells  
15 (Fig. 17B) were used.

Fig. 18 shows a time course of cell death induction by 2D7DB (2 µg/ml). Cell death induction was investigated at three through to six hours. ARH77 cells (Fig. 18A) and Jurkat cells (Fig. 18B) were used.

Fig. 19 shows the effect of Z-VAD-FMK on cell death due to 2D7DB. The study was  
20 performed using ARH77 cells 16 hours after induction.

Fig. 20 shows the effect of Z-VAD-FMK on cell death due to 2D7DB. The study was performed using Jurkat cells 16 hours after induction.

Fig. 21 is a set of photographs showing that cell death due to 2D7DB is not accompanied by DNA fragmentation. The study was performed 24 hours after cell death  
25 induction.

Fig. 22 shows the results of investigating the effect of cytochalasin D on the cell death-inducing activity of 2D7DB. By pre-treating ARH77 cells with cytochalasin D, which is an actin-polymerization inhibitor, the cells showed resistance to 2D7DB-induced cell death.

Fig. 23 is a set of photographs showing the results of immunostaining to investigate the  
30 state of the intracellular actin and nuclei. After reacting ARH77 cells under the conditions described in the figure, actin was detected using anti-actin antibody (red), and cell nuclei were detected using Hoechst 33258 (blue). Actin was absent from cells treated with 2D7DB.

Fig. 24 shows that the 2D7DB suppresses an increase in human IgG (hIgG) concentration in serum in a mouse model of human myeloma. The data shows the average +  
35 SEM. There was a significant difference (\*:  $p < 0.05$ ) between the vehicle-administered group and the 2D7DB-administered group, according to unpaired t-tests.

Fig. 25 shows that the 2D7DB has a life-prolonging effect in a mouse model of human myeloma. There was a significant difference (\*:  $p < 0.05$ ) between the vehicle-administered group and the 2D7DB-administered group, according to generalized Wilcoxon tests.

Fig. 26 shows analyses of the action of 2D7DB on PBMC. PHA-M (Fig. 26A), ConA (Fig. 26B), and SAC (Fig. 26C) were used as mitogens. Fig. 26D shows the results in the absence of a mitogen, and Fig. 26E shows the results of a positive control (ARH77). The results shown are, from the top, those of no 2D7DB addition, three-hour addition, and 24-hour addition.

#### 10 Best Mode for Carrying out the Invention

Herein below, the present invention is specifically described using Examples; however, it should not to be construed as being limited thereto.

##### [1] Cell lines

15 Human myeloma cell lines (RPMI8226, K562, and ARH77), human T-cell leukemia cell line (Jurkat), FDC-P1, HCI-16, and 2D7 hybridoma cell line (from University of Tokushima) were cultured in RPMI1640 medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Human myeloma cell lines (IL-KM3 and U266) were individually cultured in the same medium supplemented with 2 ng/ml of IL-6 (R & D), and Ba/F3 was cultured in the same  
20 medium supplemented with 2 ng/ml of IL-3 (R & D). COS7, 293T, HeLa, NIH3T3, and BOSC23 were cultured in DMEM medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% FCS, and CHO was cultured in  $\alpha$ -MEM medium (GIBCO BRL) supplemented with 5% FCS or 10% FCS.

##### [2] Production of pMX2 vectors

25 The GFP gene region of the retrovirus vector, pMX-GFP, which packages the GFP gene in the virus particle, was cut out and removed using EcoRI-SalI. The adaptor, which comprised a BstXI site in its sequence (Fig. 1) (and was synthesized with an ABI DNA synthesizer, then annealed *in vitro* before use), was inserted into this region, forming pMX2.

##### 30 [3] Production of cDNA libraries

Total RNA was purified from RPMI8226 cells by standard methods using Trisol (GIBCO BRL). Furthermore, the mRNAs were purified from 200  $\mu$ g of this total RNA, using a  $\mu$ MACS mRNA Isolation kit (Milttenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were synthesized using random hexamers (SuperScript Choice System for cDNA  
35 Synthesis; Invitrogen) with 3.6  $\mu$ g of mRNA as template, and then a BstXI adaptor (Invitrogen) was linked to both ends. This cDNA was inserted into a pMX2 vector cleaved with BstXI, and

was introduced into ELECTRO MAX DH10B (GIBCO BRL) by electroporation (2.5 KV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F). After adding 1 ml of SOC, the vectors were then incubated at 37°C for one hour, 1 ml of 40% glycerol/LB+Amp was added. A portion of the culture was used to check the titer and the remainder was stored at -80°C. The obtained library was plated at 200  $\mu$ l/well (7%  
5 DMSO/LB+Amp) into two 96-well plates, so that each well contained 1000 clones. These were cultured overnight at 37°C. Four wells (4000 clones) from this plate were combined and placed into an ampicillin-containing LB medium (4 ml). This was defined as one pool, the rest of the wells were treated similarly. Ultimately, 24 pools were prepared from a single plate. After incubating each pool overnight at 37°C, DNAs were prepared (QIAGEN) and used for  
10 transfection into packaging cells. The plates used for inoculation were stored at -80°C until used for secondary screening.

#### [4] Purification of antibodies

0.5 ml of ascites, sent from University of Tokushima, was adsorbed to a Protein A Hi  
15 Trap Affinity column (Amersham Pharmacia). The IgG fraction was then eluted using 0.1 M sodium citrate, pH3.0, and the 2D7 antibody was collected. This was concentrated using Centricon (YM-10; Millipore), and the buffer was exchanged to PBS to ultimately yield a total of 5.34 mg of antibody. This was separated into aliquots and stored at -20°C (concentration: 0.89  $\mu$ g/ $\mu$ L).

20

#### [5] FACS

Adherent cells were detached using 1 mM EDTA/PBS, and suspended cells were collected by centrifugation, then suspended in FACS buffer (2.5% FCS, 0.02%  $\text{NaN}_3$ /PBS). These cells were left to stand on ice for one hour in a buffer (5% FCS/PBS) containing 2D7  
25 antibody (final concentration 10  $\mu$ g/ml). These were then washed with FACS buffer, reacted in a solution of FITC-anti-mouse IgG (Immunotech) (1:150, 50  $\mu$ L FACS buffer) on ice for 30 minutes, washed twice with FACS buffer, and then analyzed using EPICS ELITE (COULTER).

#### [6] Retrovirus infection

##### 30 (i) Retrovirus packaging

The day before transfection, 2ml of BOSC23 cells, which are retrovirus-packaging cells, were plated onto a 6-well plate at  $6 \times 10^5$  cells/well. Transfection was carried out by the following procedure: 1  $\mu$ g of the plasmid DNA derived from each pool was mixed with 3  $\mu$ L of FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), left to stand at room temperature for 20 minutes, and  
35 then added to the BOSC23 cell culture medium plated the day before. Cells were then cultured at 37°C for 48 hours, and the culture medium was collected. Dead cells were removed by

centrifugation at 3000 rpm for five minutes, and the culture solution was then used as the virus solution.

(ii) Virus infection

The 2 ml of NIH3T3 cells plated onto 6-well plates at  $1 \times 10^5$  cells/well the day before were cultured for 24 hours in 1 ml of virus solution supplemented with 10  $\mu\text{g/ml}$  of polybrene (hexadimethrine bromide; Sigma). 1.5 ml of fresh medium was then added, the cells were cultured for another 48 hours, and gene expression was then analyzed using FACS.

[7] Immunoprecipitation

Cells were lysed in a lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin), and the resulting solution was centrifuged to remove the insoluble proteins and obtain a cell lysate. 1  $\mu\text{g}$  of 2D7 antibody was added, and incubated at 4°C for four hours. Magnetic protein G (BioMag) was then added, and this was incubated for another one hour. Subsequently, the immunoconjugate was washed three times with a lysis buffer, and then subjected to SDS-PAGE. This gel was silver stained (Daiichi Pure Chemicals) according to the attached instructions. On the other hand, for peptide sequencing, the gel on which SDS-PAGE was performed was transferred to ProBlott (Applied Biosystems), and this was stained for one minute with Coomassie blue staining solution (0.1% coomassie blue R-250 in 40% MetOH/ 1% acetic acid). After washing several times with 50% MetOH, the band of interest was cut out, washed five times with 1 ml of DDW, dried *in vacuo*, and then subjected to peptide sequencing.

[8] Cell growth assay using the 2D7 antibody

Each type of cell was plated into a 96-well plate at  $1 \times 10^6$  cells/ml in the presence or absence of PMA (50 ng/ml; GIBCO BRL) and PHA (10  $\mu\text{l/ml}$ ; GIBCO BRL). After subsequent addition (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or no addition of the 2D7 antibody, this was cultured for 48 hours. After culturing, morphological changes in the cells were observed under a microscope. Viable cell count was determined by adding WST-8 (viable cell count reagent SF; Nacalai Tesque), culturing at 37°C for two hours, and measuring OD<sub>450</sub> to measure the relative viable cell count.

[9] Induction of cell death by cross-linking

Jurkat cells were plated on a 24-well plate at  $8 \times 10^5$  cells/well, and 10  $\mu\text{g/ml}$  of anti-mouse IgG (Fc) antibody (Cappel) was further added in the presence (5  $\mu\text{g/ml}$ ) or absence of 2D7 antibody. 48 hours later, the cells were collected, and after washing with PBS, methanol was added to a concentration of 70%, and this was left to stand at -20°C for 15 minutes. After

washing the cells with FACS buffer several times, Hoechst 33258 was added at a concentration of 10 µg/ml, and this was incubated at room temperature for 30 minutes. The cells were washed again with FACS Buffer, and then placed on a slide glass as a droplet to observe the state of the nuclei under a fluorescence microscope.

5

#### [10] Cloning of the 2D7 variable region

Total RNA was purified from 2D7 hybridoma (provided from University of Tokushima) using Trizol according to standard methods. Using 3 µg of this RNA as a template, cDNAs were synthesized using a SMART RACE cDNA Amplification kit (CLONTECH), according to the attached instructions. Using this cDNA as a template, the variable regions of the heavy chain and light chain were amplified by PCR using the following primers:

10

Heavy chain: 5'-CAGGGGCCAGTGGATAGACTGATG (SEQ ID NO: 9)

Light chain: 5'-GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG (SEQ ID NO: 10)

The amplified cDNAs encoding each of variable regions were subcloned into pCR-TOPO vector (Invitrogen), and the nucleotide sequences (SEQ ID NOs: 1 and 3) were determined.

15

#### [11] Production of 2D7 diabody expression vector

Plasmids, to which each of the variable region cDNAs were subcloned, were used as templates, and the variable regions of the heavy chain and light chain (VH and VL) were respectively amplified using the primers below:

20

Heavy chain

2D7DB-H1: 5'-CCTGAATTCCACCATGCGATGGAGCTGGATCTTTC (SEQ ID NO: 11)

2D7DB-H2: 5'-AATTGCGCTACCGCCTCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCCT (SEQ ID NO: 12)

25

Light chain

2D7DB-L1: 5'-TCCTCAGGTGGAGGCGGTAGCCAAATTGTTCTCACCCAGTCGCCAGC (SEQ ID NO: 13)

2D7DB-L2:

5'-ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAGTCTTTTATCTCCAACCTTG TCCCCGAGCC (SEQ ID NO: 14)

30

Each of the VH and VL cDNAs amplified by these primers were combined into one tube, and further subjected to PCR. Using the PCR products as templates, PCR was performed again, this time using 2D7DB-H1 and 2D7DB-L2 as primers, to synthesize cDNA with VH and VL linked through a 5-mer linker (SEQ ID NO: 5). This cDNA was digested with EcoRI-NotI and inserted into the EcoRI-NotI gap of the animal cell expression vector, pCXND3. The nucleotide sequence was confirmed, completing the construction of the 2D7 diabody expression

35



vector, pCXND3-2D7DB.

[12] Transient expression in COS7 cells

2 µg of pCXND3-2D7DB, or of an empty vector used as a control, was mixed with 6 µL of transfection reagent (LT-1, MIRUS) according to the attached instructions, and this was added to COS7 cells (plated the day before into a 6-well plate at  $1 \times 10^5$  cells/well) whose medium had been exchanged to a serum-free medium (OPTI-MEM, GIBCO BRL). Five hours later, 200 µL of serum was added, and this was cultured for two to three days. The medium was collected, and dead cells were removed by centrifugation. The culture supernatant was then used for an experiment to detect cytotoxic activity.

Expression of 2D7DB in the culture supernatant was confirmed by Western blotting. More specifically, equal amounts of 2x SDS-PAGE Sample buffer and culture supernatant were added. In addition, after lysing the cells by adding a lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), insolubilized proteins were removed by centrifugation to prepare a cell lysate, and an equal amount of 2x SDS-PAGE Sample buffer was added to this. After performing SDS-PAGE on each sample, the gels were transferred to PVDF membranes, and expression of the 2D7 single chain was detected using anti-FLAG antibody.

[13] Establishment of expression cell lines producing 2D7 diabody

20 µg of pCXND3-2D7DB, linearized by cleaving with PvuI, was introduced to CHO cells (DXB11 strain) by electroporation, as described below.

After washing the CHO cells twice with ice-cold PBS, they were suspended in PBS at  $1 \times 10^7$  cells/ml. 20 µg of the above-mentioned plasmid was mixed into these cells, and this was electropulsed (1.5 KV, 25 µFD). The cells were diluted in to appropriate fractions, plated on to a 10 cm dish, and cultured in the presence of G418 (GIBCO BRL) at a final concentration of 50 µg/ml. Approximately 30 clones were selected from the grown colonies, and the diabody expression levels in the culture supernatants were investigated by Western blotting. The clone with the highest expression level was expanded in a nucleic acid-free MEMα medium containing 5 nM MTX, and this was stocked as an overproducing cell line.

[14] Large-scale purification of 2D7 diabodies

A subconfluent 2D7DB-producing CHO cell line in a T-125 flask was detached using Trypsin-EDTA, and then this was transferred to a roller bottle (250 ml of MEMα without nucleotide + 5% FCS). Four days later, the culture solution was removed, and the cells were washed twice with PBS. The medium was then exchanged to 250 ml of CHO-S-SFMII medium (GIBCO BRL) to produce a serum-free medium, cells were cultured for three days, and

then the cell culture supernatant was collected. After removing the dead cells by centrifugation, this was filtered and used for purification.

Purification of single chain Fv was performed as follows: First, the collected culture supernatant was applied and adsorbed onto an anti-Flag M2 column. After washing with buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20), single chain Fv was eluted with buffer B (100 mM Glycine pH3.5, 0.01% Tween 20). The collected sample was immediately neutralized with Tris-HCl pH8.0 so that the final concentration was 25 mM. This was then used for gel filtration purification by a Superdex 200HR (26/60) column. The dimer fraction of single chain Fv was collected in PBS containing 0.01% Tween 20. A portion of the collected sample was subjected to SDS electrophoresis and silver staining to confirm that the protein of interest has been purified, and then this was concentrated to produce a purified authentic sample of 2D7 diabody.

#### [15] Cell death induction experiment using 2D7 diabody

Various hemocyte cell lines were plated into 24-well plates at  $2-5 \times 10^5$  cells/well. Purified 2D7DB, or the culture supernatant of COS7 transiently expressing 2D7DB, was added and cell death was induced. When used, the culture supernatant of COS7 transiently expressing 2D7DB was added so its concentration was 50%. The amount of medium in each well was 0.8 to 1 ml/well. When stimulating Jurkat cells, Con A (WAKO) was added at the time of 2D7DB addition to a final concentration of 2  $\mu$ g/ml.

Adherent cells (HeLa) were plated into a 6-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/well, and the cells were attached by culturing overnight. Subsequently, purified 2D7DB was added to the culture solution.

Several hours to several days after 2D7DB addition, the suspended cells were collected as they were, and adherent cells were collected after detaching the cells with 1 mM EDTA/PBS. The cells were then washed with ice-cold PBS, and labeled with Annexin V, which is an apoptosis marker, and with PI, which is a dead-cell marker, according to the attached instructions (TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, TREVIGEN Instructions). The proportion of stained cells was then measured using flow cytometry (EPICS ELITE, COULTER).

#### [16] Cell death induction by Actinomycin D

Various hemocyte cell lines were plated into 24-well plates at  $2-5 \times 10^5$  cells/well. To inhibit the initial stage of apoptosis, a caspase inhibitor (Z-VAD-FMK, Promega) was added at a final concentration of 50  $\mu$ M, and after incubating for 2.5 hours, cell death was induced. For cell death induction by Actinomycin D, Actinomycin D (Sigma) was added at 1  $\mu$ g/ml (Jurkat) or 5  $\mu$ g/ml (ARH77), and for cell death induction by 2D7DB, 2  $\mu$ g/ml of purified 2D7DB was

added. Cells were collected 16 hours after cell death induction, and stained using Annexin V and PI.

[17] Cell growth assay using 2D7 diabody

5 Each type of cells was plated into a 96-well plate at a cell concentration of  $1-2 \times 10^4$  cells/well. 2D7DB was added at an appropriate concentration, and the cell count was determined after three days of culturing. Viable cell count was determined using WST-8. More specifically, this reagent was added to the cells at 10  $\mu$ l/well, and the cells were then cultured at 37°C for 1.5 hours. The relative viable cell count was determined by measuring the  
10 OD<sub>450</sub> using a spectrophotometer. The growth suppression rate was calculated from  $(1 - (\text{OD}_{450} \text{ of 2D7DB treated cells} / \text{OD}_{450} \text{ of 2D7DB untreated cells})) \times 100$ .

[18] Detection of DNA fragmentation

ARH77 and Jurkat cells were plated into a 6-well plate so that the cell concentration  
15 was  $2 \times 10^6$  cells/well, and cell death was induced by adding purified 2D7DB at a final concentration of 2  $\mu$ g/ml, or Actinomycin D at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml (ARH77) or 5  $\mu$ g/ml (Jurkat) to each well. The control was a well to which nothing was added. After culturing for 24 hours, the cells were collected, washed once with PBS, and then lysed in a lysis buffer (10 mM Tris pH7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100). This was followed by  
20 centrifugation to remove the insoluble proteins, and then the material was treated with RNase A and Proteinase K. A portion of this was then subjected to agarose gel electrophoresis to detect chromatin DNA fragmentation.

[19] Inhibition of cell death induction by cytochalasin D

25 ARH77 cells were plated into a 24-well plate to achieve a cell concentration of  $5 \times 10^5$  cells/well, and cytochalasin D (Sigma) was added to a final concentration of 20  $\mu$ g/ml. The control was a well to which ethanol alone was added. After culturing for one hour, purified 2D7DB was added at various concentrations (0, 200, 500, 1000 ng/ml), and culturing was continued for another four hours. Cells were then collected, and the proportion of dead cells  
30 was detected by staining with PI.

[20] Immunostaining of 2D7DB-treated cells using anti-actin antibody

2D7DB was added at a concentration of 1  $\mu$ g/ml to cytochalasin D-treated/-untreated ARH77 cells, and after culturing at 37°C for 15 minutes, the cells were adhered to a slide glass  
35 with Cytospin. After immobilizing the cells by immersion in methanol for 15 minutes at -20°C, blocking was performed using a blocking buffer (3% BSA/PBS) at 4°C for one hour. This was

then reacted with CY3-labeled anti-actin antibody (Sigma) diluted 100-fold in 1% BSA/PBS for one hour at room temperature, and then the cell nuclei were stained with Hoechst 33258. After washing several times with PBS, the cells were observed under a confocal laser scanning microscope (Olympus).

5

[Example 1] Expression analysis of 2D7 antigen in each type of cell line

To determine the cell line that should become the source to produce a cDNA expression library and the cell line that should become the host, 2D7 antigen expression in each type of animal cell was analyzed using FACS (Fig. 2A and Fig. 2B). As a result, among  
10 human-derived hemocyte cells, extremely strong expression of the 2D7 antigen was observed in lymphocytic tumor cell lines, RPMI8226, U266, and in Jurkat, but expression was found to be weak in K562. In Ba/F3, FDC-P1, and HCI-16, which are hemocytes derived from mice, expression was very weak, perhaps due to differences between the species. Of the adherent cells, expression was observed in COS7, 293T, and HeLa. Expression was hardly observed in  
15 mouse NIH3T3 cells.

From the expression patterns mentioned above, RPMI8226 cells were judged to be appropriate as a source of a cDNA library to be used for expression cloning, and NIH3T3 cells were determined to be appropriate as host cells to be used for screening, to which the expression library is transferred.

20

[Example 2] Cloning of 2D7 antigen

[1] Cloning from a protein

Cell lysates were prepared from RPMI8226 cells and U266 cells, which express the 2D7 antigen, and NIH3T3 cells, which do not express the 2D7 antigen, and immunoprecipitation was  
25 performed using the 2D7 antibody. As a result, a molecule (approximately 12 kD) that precipitates specifically in RPMI8226 and U266 cells was observed (Fig. 3). This molecule was not detected by Western blotting using the 2D7 antibody, but since it is at least reproducibly precipitated by the 2D7 antibody, it was strongly predicted to be the 2D7 antigen itself, or a molecule that co-precipitates with the 2D7 antigen.

30

Coomassie staining was performed on this band; it was then cut out and the peptides were sequenced. As a result, this 12 kD molecule was identified as  $\beta$ 2 microglobulin ( $\beta$ 2M). Since  $\beta$ 2M is one of the class I MHC protein complexes that associate with HLA class I through non-covalent bonds, the 2D7 antibody is considered to have co-precipitated it as an HLA complex. HLA class I comprises the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 domains required for antigen presentation, and  
35 the  $\alpha$ 3 domain which binds to  $\beta$ 2M. Since the 2D7 antibody can co-precipitate the  $\beta$ 2M molecule, it is anticipated that the 2D7 antibody will recognize the  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 domains of HLA class

I as an epitope.

## [2] Expression cloning of genes

cDNAs were synthesized using random hexamers from mRNAs purified from the 2D7 antigen-expressing cells, RPMI8226. These were inserted into a retrovirus vector, pMX2, and a retrovirus expression library was constructed. The library titer was investigated, and found to include a total of  $6 \times 10^6$  clones. Furthermore, the average cDNA length was found to be approximately 1.5 kb, arrived at by randomly selecting 24 clones from this library and investigating their insert size using colony PCR. Thus, the produced expression library was judged to be sufficient for use in expression cloning.

Fig. 4A and Fig. 4B show a flow diagram of the screening described below. In the first screening, 4000 independent clones were used in one pool, and 24 pools (corresponding to 96000 clones) were produced. The plasmids were packaged into retroviruses by transfecting each plasmid into BOSC23 cells. The resulting viruses derived from each pool were infected into NIH3T3 cells. Three days after infection, the cells were detached, and after staining with 2D7 antibody, expression analysis was performed using FACS. As a result, compared to NIH3T3 cells infected with viruses derived from an empty vector (control), 2D7-positive cells were found in 3 of the 24 pools (pools 4, 13, and 21).

Next, pools 4 and 13, which showed positive results in the first screening, were divided into four pools each comprising 1000 independent clones, and a second screening was performed. As a result, a single clearly positive pool was found from each pool (Fig. 5A, pool 4-4, and pool 13-1). Pool 13-1 was further divided into 21 pools, each comprising 160 independent clones, to perform a third screening. Two positive pools (Fig. 5B, 13-1-11 and 13-1-21) were identified. Subsequently, pool 13-1-11 was divided into eight pools, each comprising 20 clones, to perform a fourth screening, and a positive pool (Fig. 5C, 13-1-11-5) was obtained.

This pool was spread onto an LB plate, 64 colonies were picked one by one, and each of these were inoculated to one well of a 96-well plate. The eight clones in the vertical rows were taken as one pool to produce eight pools (1 to 8), and the eight clones in the horizontal rows were taken as one pool to produce eight pools (A to H), and a fifth screening was performed. As a result, pools 3, 4, 6, and 8, and pools E, F, and G were positive, thus narrowing down the positive candidate clones to twelve clones (Fig. 6A). FACS was performed on these twelve clones, and ultimately four positive clones (3F, 4G, 6E, and 8G) were identified as a single clone recognized by the 2D7 antibody (Fig. 6B).

As a result of reading the sequence of the insert portion of these clones, all four clones were found to be the full-length cDNA sequence of Human MHC class I HLA-A-6802.

HLA-A is classified into several dozen types of haplotypes. As a result of this cloning,

the A\*6802 haplotype of HLA class I was identified as a 2D7 antigen, but since the 2D7 antibody recognizes a wide variety of cells, the haplotype of HLA class I in the RPMI8226 cells that were used as the gene source just happened to be A\*6802, and the 2D7 antibody was considered to be an antibody that recognizes any haplotype of HLA class I molecules.

5 [Example 3] Examination of growth inhibitory effect

Several types of leukemia cell lines (K562, Jurkat, and RPMI8226) were used to investigate whether the 2D7 antibody has a cytotoxic effect. The expression level of the 2D7 antigen in the three cell lines is: K562, weakly positive; Jurkat and RPMI8226, strongly positive.

10 K562 and Jurkat cells were plated in the presence or absence of PHA and PMA, and 10 µg/ml of the 2D7 antibody was added thereto. On observing the cells 24 hours later, weakly 2D7-positive K562 cells did not show obvious differences in their morphology due to the presence or absence of the 2D7 antibody, however, addition of 2D7 antibody resulted in significant cell aggregation in Jurkat cells strongly expressing 2D7 (Fig. 7B and Fig. 7C).

15 However, growth inhibition due to addition of the 2D7 antibody was not observed (Fig. 7A). Growth inhibition due to 2D7 in Jurkat cells activated by PHA and PMA stimulation was also not observed.

Unexpectedly, addition of 2D7 antibody did not have an obvious effect on the morphology and growth of the strongly 2D7-positive RPMI8226 cells (Fig. 7D).

20 Next, it was examined whether cytotoxic effects can be observed by adding anti-mouse IgG(Fc) antibody to 2D7 antibody, to cross-link the antibodies. Anti-mouse IgG was added to Jurkat cells, in the presence or absence of 2D7 antibody. The cells were cultured, and 48 hours later the cell nuclei were stained with Hoechst33258. Cells were observed for fragmentation of cell nuclei, which is characteristic of dead cells (Fig. 8). As a result, nuclear fragmentation was  
25 observed in Jurkat cells by further cross-linking 2D7 with an antibody, indicating that cell death was induced.

[Example 4] Cloning of cDNA encoding the 2D7 antibody variable region, and the predicted diabody structure

30 Primers for the constant regions of the heavy chain and light chain of mouse IgG2b were produced, and DNA encoding the 2D7 variable region was cloned by 5'RACE method. The nucleotide sequences of the obtained PCR products are shown in SEQ ID NO: 1 and 3.

A single chain was then constructed based on these sequences. As shown in Fig. 9 and Fig. 10A, the 2D7 single chain is composed of the leader sequence of the heavy chain, the  
35 variable region of the heavy chain, and then across from a 5mer linker (GGGGS), the variable region of a light chain, followed by a cDNA (SEQ ID NO: 5) encoding a Flag-tag.

Dimerization of this single chain may cause the 2D7 diabody to form the structure shown in Fig. 10B.

[Example 5] Analysis of the cytotoxic activity of the 2D7 diabody

5 (i) Cytotoxic activity of the 2D7 diabody transiently expressed in COS7

A 2D7 diabody expression vector was transfected into COS7 cells, and the culture supernatant was collected three days later. The culture supernatant and cell lysate were subjected to SDS-PAGE, and after performing Western blotting with an anti-Flag-tag antibody, a 2D7 single chain was found to be secreted in the culture supernatant (Fig. 10C).

10 This culture supernatant was added to Jurkat cells at a ratio of 50%. The percentage of dead cells was measured by staining the cells with PI and Annexin V a few days later. No significant change in the apoptosis marker was observed in Jurkat cells to which just the anti-BST-1 antibody and 2D7 antibody (5 µg/ml each) were added. Furthermore, no particular change could be observed when using the culture supernatant of COS7 transfected with the  
15 vector alone. On the other hand, cell death was clearly induced in Jurkat cells to which the culture supernatant of COS7 expressing 2D7DB was added (Fig. 11A and Fig. 11B).

Next, to investigate the HLA class I A-specific action of this 2D7DB, a similar experiment was performed using K562 cells, which are known to not express HLA class I A. As a result, 2D7DB had absolutely no influence on K562 cells, although it showed cell death  
20 inducing activity against Jurkat cells (Fig. 12A and Fig. 12B). This strongly supports the idea that the cell death inducing activity of 2D7DB is an action targeting HLA class I A, which is its epitope. Furthermore, according to each data, the sensitivity of Jurkat cells towards 2D7DB was found to be slightly higher in cells stimulated with con A.

Next, the action of 2D7DB on other myeloma cell lines was analyzed. RPMI8226,  
25 IL-KM3, U266, and ARH77 were incubated with culture supernatant in which the vector alone was transfected (control), or with the 2D7DB-expressing COS7 culture supernatant. Two days later these cultures were double stained with Annexin V and PI, and analyzed using a flow cytometer. As a result, incubation with 2D7DB was found to significantly induce cell death in all of the cells (Fig. 13A to Fig. 13D).

30

(ii) Cytotoxic activity of purified 2D7DB

The growth inhibitory effect of purified 2D7DB on each type of cell line (RPMI8226, ARH77, U266, and Jurkat) was analyzed. 2D7DB was added at 0, 0.5, 1.0, and 2.0 µg/ml, and the number of cells was counted three days later. As a result, 2D7DB was found to inhibit cell  
35 growth of these cells in a concentration-dependent manner (Fig. 14).

Purified 2D7DB was then added, and 48 hours later, cells were stained with cell death

markers, PI and Annexin V, and then analyzed. As in the results obtained when using 2D7DB transiently expressed in COS7, cell death was induced in Jurkat and ARH77 in a concentration-dependent manner, and K562 was not affected at all (Fig. 15A to Fig. 15C). Furthermore, 48 hours after the addition of 2D7DB to U266 and IL-KM3, significant cell death inducing activity was confirmed (Fig. 16A and Fig. 16B).

On the other hand, although the 2D7 antibody stained the adherent HeLa cells very well, 2D7DB had absolutely no influence under the same conditions (Fig. 15 D). This suggested that 2D7DB may act specifically on suspended cells, such as hemocyte cells.

Next, the time taken for 2D7DB to induce cell death was analyzed. 2 µg/ml of 2D7DB was added to ARH77 and Jurkat cells, cells were collected 12, 24, and 38 hours later, and stained with a cell death marker. The results showed that cell death was already induced in all cells twelve hours later (Fig. 17A and Fig. 17B). Therefore, cell death induction was investigated at earlier times (three and six hours). Surprisingly, it was shown that 2D7DB induces cell death at least within three hours after its addition (Fig. 18A and Fig. 18B). These results strongly support the idea that 2D7DB has a very strong cell death-inducing activity. Since 2D7DB strongly induces cell death, sufficient drug efficacy can be expected even with a short half life in the blood. Furthermore, safety becomes a concern if the whole antibody has strong cell death-inducing activity, considering the length of the half life in the blood; however, producing a diabody can overcome such problems.

Next, analyses were performed to determine whether cell death due to 2D7DB is induced through caspase activation, that is, whether it is apoptosis. As shown in Fig. 19 and Fig. 20, significant apoptosis was induced when ARH77 and Jurkat cells were treated with the apoptosis-inducing agent Actinomycin D, and then stained 16 hours later with Annexin V and PI. After pre-treating cells under these conditions with caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 2.5 hours, apoptosis due to Actinomycin D was suppressed. However, cell death induced by 2D7DB was not inhibited at all by pretreatment with Z-VAD-FMK. These results show that 2D7DB induces cell death by a mechanism different from the ordinary caspase-mediated apoptosis mechanism.

To confirm this, fragmentation of chromatin DNA, known to be the most characteristic biochemical change accompanying apoptosis, was also analyzed.

ARH77 and Jurkat cells were treated with 2D7DB (2 µg/ml) or Actinomycin D, and DNAs were collected from the cells 24 hours later and subjected to electrophoresis (Fig. 21). As a result, DNA fragmentation characteristic of apoptosis had been induced in all cells treated with Actinomycin D, which is an apoptosis-inducing agent. On the other hand, DNA fragmentation was not observed at all in 2D7DB-treated cells, even though the concentration of added 2D7DB was absolutely sufficient to induce cell death. These results also strongly support the idea that cell death due to 2D7DB is an unknown type of cell death, unaccompanied



by the characteristics of apoptosis.

From the above-mentioned results, cell death due to 2D7DB was found to be caused by a pathway different from previously known cell death induction mechanisms. Therefore, further analysis was performed to elucidate the mechanism of cell death induction by 2D7DB.

5 From the experiments described above, when 2D7DB was reacted with the cells, the cell membranes were often observed to be destroyed under the microscope. Therefore, 2D7DB was presumed to have some sort of influence on the actin skeleton. In order to examine such a possibility, an actin polymerization inhibitor (cytochalasin D) was made to act on the cells, and the influence of 2D7DB on cell death induction activity was analyzed.

10 Cytochalasin D (20  $\mu\text{g/ml}$ ) or ethanol alone (control) was added to ARH77 cells, and 1 hour later, 2D7DB was added at various concentrations. After a 4-hour incubation from the 2D7DB addition, cells were collected, PI staining was performed and the percentage of dead cells was measured (Fig. 22). As a result, pretreatment of cells with cytochalasin D was found to cause loss of sensitivity towards 2D7DB. These results suggested that 2D7DB causes some  
15 kind of effect on the cytoskeletal system, such as actin, to induce cell death by binding to HLA-class IA, which is the target molecule.

Therefore, cells treated with 2D7DB were stained by the actin antibody, and the dynamic change of the cytoskeletal system due to 2D7DB addition was analyzed visually. ARH77 cells were treated with 2D7DB, and 15 minutes later, the cells were immobilized with  
20 methanol, and the state of actin (red) in the cells was investigated by immunostaining (Fig. 23). As a result, compared to the image from those not treated with 2D7DB, significant destruction of the actin skeleton in the cell due to 2D7DB was observed.

The above-mentioned results strongly suggested that cell death due to 2D7DB may be caused by destruction of the actin skeleton in cells by 2D7DB bound to HLA class IA. This is a  
25 completely new type of cell death induction mechanism that has not been reported to date.

#### [Example 6] Drug efficacy test for 2D7 diabody using human myeloma animal model

##### (1) Production of mouse model for human myeloma

A mouse model for human myeloma was produced as follows. ARH 77 cells were  
30 prepared to reach  $2.5 \times 10^7$  cells/ml in RPMI1640 medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO BRL), and then 200  $\mu\text{L}$  of the above-mentioned ARH77 cell suspension ( $5 \times 10^6$  cells/mouse) was injected to SCID mice (male, 6 weeks old, Clea Japan) pretreated the day before with intraperitoneal administration of 0.2 mg of anti-asialo GM1 antibody (Wako Pure Chemicals) from the tail vein.

35

##### (2) Preparation of the antibody to be administered

On the day of administration, a 2D7 diabody was prepared at 0.8 mg/ml using filter-sterilized PBS(-), and this was used as the administration sample.

### (3) Antibody administration

5 To the mouse model of human myeloma produced in (1), the administration sample prepared in (2) was administered through the tail vein at 10 ml/kg twice a day for 3 days from the first day after engraftment of ARH77 cells. As a negative control (vehicle), filter-sterilized PBS(-) was administered similarly at 10 ml/kg through the tail vein twice a day for 3 days. The antibody-administered group had 7 animals per group, and the vehicle-administered group had 8  
10 animals per group.

### (4) Human IgG assay of mouse serum

The quantity of human IgG produced by human myeloma cells in the mouse serum was determined by ELISA described below. 100  $\mu$ L of goat anti-human IgG antibody  
15 (BIOSOURCE) diluted to 1  $\mu$ g/ml with 0.1% bicarbonate buffer (pH9.6) was placed into a 96-well plate (Nunc), this was incubated at 4°C overnight, and the antibody was immobilized. After blocking, mouse serum diluted in a stepwise manner, or as the authentic sample, 100  $\mu$ L of human IgG (Cappel) was added, and this was incubated at room temperature for 1 hour. After  
20 washing, 100  $\mu$ L of a 5000-fold diluted alkaline phosphatase-labeled anti-human IgG antibody (BIOSOURCE) was added, and this was incubated at room temperature for 1 hour. After washing, substrate solution was added, and after incubation, absorbance at 405 nm was measured using MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad), and the concentration of human IgG in mouse serum was calculated from the calibration curve obtained from the absorbance of the authentic human IgG sample.

25

### (5) Evaluation of anti-tumor effect

The anti-tumor effect of the 2D7 diabody on a human myeloma mouse model was evaluated using the change in the amount of human IgG (M protein) produced by the myeloma cells in mouse serum, and by the survival time. Regarding the change in human IgG level in  
30 mouse serum, serum was collected on the 24th day after transplanting the ARH77 cells, and the human IgG level was measured by the ELISA described above in (4). As a result, the level of human IgG (M protein) in the serum had increased in the vehicle-administered group to approximately 74  $\mu$ g/ml. In contrast, the level in the 2D7 diabody-administered group was significantly lower than in the control group ( $P < 0.005$ , unpaired t-test), and 2D7 diabody was  
35 shown to very strongly suppress the growth of ARH77 cells (Fig. 24). With regards to survival time, as shown in Fig. 25, the 2D7 diabody-administered group showed a significant increase in

survival time compared to the vehicle-administered group.

Accordingly, the 2D7 diabody was shown to have an antitumor effect on the mouse model of human myeloma. The antitumor effect of the 2D7 diabodies of this invention may be based on the cell death-inducing action of this antibody.

5

[Example 7] Analysis of the action of 2D7DB on PBMC

The action of 2D7DB on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was analyzed. PBMCs were purified from the peripheral blood of a healthy adult volunteer by density gradient centrifugation. The PBMCs were plated at  $5 \times 10^5$  cells/1 ml/well onto a  
10 24-well plate, in the presence or absence of a mitogen. Phytohemagglutinin M (PHA-M, Roche Diagnostics, final concentration: 10  $\mu$ g/ml), concanavalin A (ConA, Wako, final concentration: 10  $\mu$ g/ml), and SAC (Pansorbin Cells, Calbiochem, final concentration: 0.01%) were used as mitogens. Cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for three days. 24 or 3 hours before culture was complete, 2D7DB was added to yield a final concentration of 2  $\mu$ g/ml. After  
15 culture was complete, the cells were double stained with Annexin V and PI (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, Pharmingen), and then analyzed using a flow cytometer (EPICS XL, Coulter). As a positive control, ARH77 at  $2.5 \times 10^5$  cells/1 ml/well was cultured for 24 hours in the absence of a mitogen, and was reacted with 2D7DB, as for PBMC.

In the case of PBMC, the percentages of dead cells that were both Annexin V and  
20 PI-positive were 29%, 23%, and 25% in the absence of mitogens (in order: no addition, 3-hour addition, and 24-hour addition of 2D7DB; continued below); 20%, 45%, and 42% in the presence of PHA-M; 22%, 30%, and 34% in the presence of ConA; and 31%, 38%, and 40% in the presence of SAC (Figs. 26A to 26D). In the case of ARH77, the percentages were 16%, 56%, and 58% (Fig. 26E). These results showed that 2D7DB has hardly any effect on  
25 unstimulated PBMC, but induces cell death in a short time with mitogen-activated PBMC.

#### Industrial Applicability

This invention provides minibodies with high specific activities. By using these minibodies, adequate drug efficacy can be expected even with a short half life. The minibodies  
30 of the present invention are further expected to be able to separate drug efficacy from toxicity. In addition, since overall cost is reduced, including reducing clinical dose and production cost, economical problems of concern in the development of antibody pharmaceuticals are also expected to improve.

## CLAIMS

1. A minibody that recognizes a human leukocyte antigen (HLA).
- 5 2. The minibody of claim 1, wherein the HLA is an HLA class I.
3. The minibody of claim 2, wherein the HLA class I is an HLA-A.
4. A minibody derived from a 2D7 antibody.
- 10 5. The minibody of any one of claims 1 to 4, wherein the minibody is a diabody.
6. A minibody of any one of (a) to (d):
  - (a) a minibody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6;
  - 15 (b) a minibody functionally equivalent to the minibody of (a), and comprising an amino acid sequence with a substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6;
  - (c) a minibody comprising the amino acid sequences of CDRs of SEQ ID NOs: 2 and 4; and
  - 20 (d) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising an amino acid sequence with a substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence of the CDRs of SEQ ID NOs: 2 and 4.
7. A method for producing an HLA-recognizing antibody having increased activity by  
25 converting the HLA-recognizing antibody to a low-molecular-weight antibody.
8. The method of claim 7, wherein the HLA is an HLA class I.
9. The method of claim 8, wherein the HLA class I is an HLA-A.
- 30 10. A method for producing a 2D7 antibody having increased activity by converting the 2D7 antibody to a low-molecular-weight antibody.
11. The method of any one of claims 7 to 10, wherein the conversion step comprises  
35 conversion to a diabody.

12. The method of any one of claims 7 to 11, wherein the activity is a cell death-inducing activity or a cell growth-suppressing activity.
13. A cell death-inducing agent, comprising as an active ingredient the minibody of any one of  
5 claims 1 to 6, the minibody produced by the method of any one of claims 7 to 12, or a 2D7 antibody.
14. The cell death-inducing agent of claim 13 that induces cell death of a B cell or T cell.
- 10 15. The cell death-inducing agent of claim 14, wherein the B cell or T cell is an activated B cell or activated T cell.
16. A cell growth-suppressing agent comprising as an active ingredient the minibody of any one of claims 1 to 6, the minibody produced by the method of any one of claims 7 to 12, or a  
15 2D7 antibody.
17. An antitumor agent comprising as an active ingredient the minibody of any one of claims 1 to 6, the minibody produced by the method of any one of claims 7 to 12, or a 2D7 antibody.
- 20 18. The antitumor agent of claim 17, wherein the tumor is a blood tumor.
19. A therapeutic agent for an autoimmune disease, wherein the therapeutic agent comprises as an active ingredient the minibody of any one of claims 1 to 6, the minibody produced by the method of any one of claims 7 to 12, or a 2D7 antibody.  
25
20. The cell death-inducing agent of any one of claims 13 to 15, wherein the antibody is a diabody.
21. The cell growth-suppressing agent of claim 16, wherein the antibody is a diabody.  
30
22. The antitumor agent of claim 17 or 18, wherein the antibody is a diabody.
23. The therapeutic agent for autoimmune disease of claim 19, wherein the antibody is a diabody.

## ABSTRACT

To identify antigens of the 2D7 antibody, the present inventors cloned the 2D7 antigen. The results suggested that the 2D7 antigen is an HLA class I molecule. Based on this finding, the present inventors examined whether the 2D7 antibody has cell death-inducing activity. Nuclei fragmentation was observed when the 2D7 antibody was cross-linked with another antibody, indicating that cell-death was induced. Further, diabodies of the 2D7 antibody were found to have very strong cell death-inducing activities, even without the addition of another antibody. These results indicate that minibodies of an HLA-recognizing antibody can be used as cell death-inducing agents.